

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Sílvia Catarina Gonçalves Vilaça

**Estudo da influência do encapsulamento
de agentes antimicrobianos por
nanopartículas de sílica na atividade
antimicrobiana de têxteis funcionais**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Sílvia Catarina Gonçalves Vilaça

**Estudo da influência do encapsulamento
de agentes antimicrobianos por
nanopartículas de sílica na atividade
antimicrobiana de têxteis funcionais**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Mariana Henriques,
da
Doutora Fernanda Gomes
e da
Doutora Eva Pinho

Outubro 2016

DECLARAÇÃO DE REPRODUÇÃO

Nome: Sílvia Catarina Gonçalves Vilaça

Título dissertação: Estudo da influência do encapsulamento de agentes antimicrobianos por nanopartículas de sílica na atividade antimicrobiana de têxteis funcionais

Orientadoras: Mariana Contente Rangel Henriques; Fernanda Isabel Antunes Gomes; Eva Patrícia Paiva Santos Pinho

Ano de conclusão: 2016

Curso: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica – Ramo Tecnologia Química e Alimentar

1. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, 15/12/2016

Assinatura: _____

Agradecimentos

Antes de iniciar a apresentação da minha dissertação de mestrado, gostaria de aqui expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que direta ou indiretamente tiveram um papel fundamental durante esta jornada da minha vida.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha mãe por todo o apoio incondicional, por ter acreditado sempre em mim e por toda a luta e esforço dedicados para que este momento fosse possível. Ao meu pai, que apesar de já não estar cá, nunca me abandonou e me deu sempre aquela força espiritual e emocional quando mais precisei.

Em segundo, mas não menos importantes, gostaria de agradecer às minhas orientadoras a professora doutora Mariana Henriques, a doutora Fernanda Gomes e a doutora Eva Pinho por toda a orientação, disponibilidade, apoio e colaboração prestadas durante a realização do projeto. Obrigada por terem acreditado em mim e desculpem qualquer momento menos bom. Deixo ainda o meu agradecimento especial à Engenheira Aline Barros por toda a paciência e ajuda prestada.

Devo ainda um agradecimento especial à empresa *Success Gadget*, Nanotecnologia e Novos Materiais, Lda pela oportunidade da realização do estágio curricular e ainda ao Departamento de Engenharia Biológica/Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, que juntos permitiram as condições necessárias à realização desta dissertação.

Sendo esta a reta final de cinco anos de ensino deixo um especial agradecimento a todos os docentes que de alguma forma contribuíram para a minha instrução no curso Mestrado Integrado em Engenharia Biológica.

Por fim, mas não menos importantes, gostaria de agradecer à minha família e a todos os meus amigos, em especial à minha irmã, por me considerar um exemplo a seguir, aos meus amigos de curso, à minha grande amiga de infância Sandra e à minha madrinha de curso Cristiana por acreditarem sempre em mim e por me terem ajudado sempre, não só nesta fase, assim como em todo o meu percurso escolar e pessoal.

A todos, um enorme agradecimento do fundo do coração.

Resumo

O desenvolvimento da tecnologia juntamente com a exigência dos consumidores e a crescente preocupação com a saúde e higiene fizeram com que várias indústrias, entre as quais a indústria têxtil, se focassem no desenvolvimento de novos materiais têxteis funcionalizados, nomeadamente os materiais têxteis com propriedades antimicrobianas. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi o estudo do encapsulamento de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) por nanopartículas de sílica, avaliando a sua atividade antimicrobiana.

Numa primeira fase do projeto foi otimizado um método de quantificação de H_2O_2 por cromatografia líquida, sendo também avaliado o seu encapsulamento em nanopartículas de sílica. Posteriormente este complexo foi aplicado a um substrato têxtil caracterizado por microscopia eletrónica de varrimento (MEV) e por titulação iodométrica (quantificação do H_2O_2). O material têxtil funcionalizado (por impregnação e esgotamento) foi ainda avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana de acordo com a norma JIS L 1902:2008. Foi também avaliada, da mesma forma, a resistência do agente a lavagens do têxtil.

Na fase de otimização do método de quantificação do H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução determinou-se o limite de deteção do método que se encontra entre 17 e $165 \mu g mL^{-1}$ de H_2O_2 . Verificou-se também que a presença das nanopartículas não interferiu na quantificação de H_2O_2 tanto por cromatografia líquida de alta resolução como por iodometria.

Este projeto permitiu também verificar que ocorreu encapsulamento do H_2O_2 pelas nanopartículas de sílica. Deste modo, o uso das nanopartículas de sílica no encapsulamento do H_2O_2 revelou-se vantajoso, uma vez que se verificaram menores perdas do princípio ativo após ciclos de lavagem, comparativamente com tecidos sem nanopartículas. Verificou-se que a quantidade inicial de H_2O_2 aplicado às fibras têxteis foi suficiente para inibir o crescimento microbiano, mesmo após os ciclos de lavagens aplicados.

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o encapsulamento do H_2O_2 por nanopartículas de sílica é um processo vantajoso, uma vez que, para além de apresentar atividade antimicrobiana, confere resistência às lavagens aos têxteis funcionalizados com H_2O_2 .

Palavras-chave: peróxido de hidrogénio; encapsulamento; nanopartículas

Abstract

The development of technology jointly with consumer requirement and growing concern with the health and hygiene made a lot of industries, including textile industry, to the development of new functionalized materials, including textile materials with antimicrobial properties. So, the main objective of this work was to study the encapsulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) by silica nanoparticles and evaluating the complex antimicrobial activity on functionalized textiles.

In the first phase of the project, a quantification method for H_2O_2 by liquid chromatography was developed. The H_2O_2 encapsulation by silica nanoparticles was, also, evaluated. Posteriorly, this complex was applied to textile substrates and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and iodometric titration (quantification of H_2O_2). The antimicrobial activity of the functionalized textile materials (applied by impregnation and exhaustion) was evaluated according to standard JIS L 1902:2008. The resistance of the complex to washing was, also, analysed by the same methods.

In the optimization phase of the quantification method of H_2O_2 by liquid chromatography, the detection limit of method obtained was between 17 and 165 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of H_2O_2 .

Also, it was verified that the presence of nanoparticles didn't affect the quantification of H_2O_2 , either by liquid chromatography or by iodometric titration.

Based on the results, the H_2O_2 can be encapsulated by silica nanoparticles. Moreover, the use of silica nanoparticles for encapsulation of H_2O_2 showed to be an advantageous process, since the textile treated with the complex (nanoparticles - H_2O_2) keep more active principle after the washing cycles than the textiles without nanoparticles. It was found that de initial quantity of H_2O_2 applied to textile fibres was sufficient to inhibit the microbial growing, even after washing cycles.

In conclusion, the present work demonstrated that the encapsulation of H_2O_2 by silica nanoparticles was an advantageous process, since the complex kept the antimicrobial activity of the active substrate and provide resistance to washing on functionalized textile.

Keywords: hydrogen peroxide; encapsulation; nanoparticles

Siglas e abreviaturas

ACN – Acetonitrilo

AP – Amostra padrão

C_i – Concentração inicial

C_f – Concentração final

FM – Fase móvel

MEV – Microscopia eletrônica de varrimento

PTFE – Politetrafluoretileno

SM – Solução mãe

SP – Solução padrão

TPP – Trifenilfosfina

TPPO – Trifenilfosfina oxidada

TSA – *Tryptic Soy Agar*

TSB – *Tryptic Soy Broth*

UFCs – Unidades formadoras de colônias

V_i – Volume inicial

V_f – Volume final

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Siglas e abreviaturas	ix
Índice	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xvii
Capítulo I – Introdução	1
1 – Enquadramento/motivação e objetivos	1
1.1 – Enquadramento/motivação	1
1.2 – Objetivos	2
1.3 – A empresa	2
2 – Têxteis.....	3
2.1 – Fibras têxteis	3
2.2 – Algodão	4
3 – Acabamentos têxteis	9
3.1 Acabamentos mecânicos	9
3.2 Acabamentos químicos.....	9
3.2.1 Esgotamento.....	9
3.2.2 Impregnação	10
3.3 Acabamentos antimicrobianos	11
3.3.1 Agentes antimicrobianos	12
4 – Peróxido de hidrogénio	17
5 – Nanopartículas de sílica.....	19

6 – Metodologias.....	23
6.1 – Métodos químicos	23
6.1.1 Cromatografia líquida de alta definição	23
6.1.2 Titulação	24
6.2 – Métodos físicos	25
6.2.1 Microscopia eletrónica de varrimento	25
6.3 – Métodos biológicos.....	25
Capítulo II – Materiais e métodos	27
1 – Desenvolvimento e otimização de um método de quantificação de peróxido de hidrogénio	27
1.1 – Quantificação por cromatografia líquida de alta resolução	27
1.2 – Quantificação por iodometria.....	28
2 – Avaliação do encapsulamento de peróxido de hidrogénio por nanopartículas de sílica ao longo do tempo	31
2.1 – Preparação das amostras.....	31
2.2- Quantificação de peróxido de hidrogénio após encapsulamento	32
2.2.1 - Cromatografia líquida de alta resolução	32
2.2.2 – Iodometria	33
3- Caracterização dos têxteis funcionalizados	33
3.1 – Preparação das amostras.....	33
3.2 – Quantificação de peróxido de hidrogénio no têxtil	34
3.3 – Caracterização da superfície das fibras funcionalizadas por MEV	35
3.4 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos têxteis funcionalizados (JIS L 1902:2008)	35
3.4.1 - Método qualitativo – Teste do halo	35
3.4.2 – Método quantitativo – Método de absorção	36

Capítulo III – Resultados e discussão	41
1 – Desenvolvimento e otimização de um método de quantificação de peróxido de hidrogénio por cromatografia líquida de alta resolução	41
1.1 – Quantificação por cromatografia líquida de alta resolução	41
1.2 – Quantificação por iodometria.....	44
2- Avaliação do encapsulamento do peróxido de hidrogénio por nanopartículas de sílica ao longo do tempo	45
3- Caracterização de têxteis funcionalizados	48
3.1 – Quantificação do peróxido de hidrogénio no têxtil	48
3.2 – Caracterização da superfície das fibras funcionalizadas por microscopia eletrónica de varrimento (MEV)	50
3.3 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos têxteis funcionalizados (JIS L 1902:2008)	53
3.3.1 – Método qualitativo – Teste do halo	53
3.3.2 – Método quantitativo – Método de absorção	57
Conclusões.....	61
Perspectivas futuras	63
Bibliografia	65

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Algodão em cru (DB algodão, 2016).....	4
Figura 1.2 – Estrutura do algodão (Machado <i>et al.</i> , 2008).	4
Figura 1.3 – Fórmula química da celulose (Wikipédia, 2016a).	5
Figura 1.4 – Esquema representativo das etapas do processo de esgotamento (Adaptado de Costa, 2014).....	10
Figura 1.5 – Esquema representativo da aplicação do princípio ativo no tecido por impregnação (Adaptado de Neto, (2016)).	11
Figura 1.6 – (a) Fórmula química e (b) estrutura química da molécula de peróxido de hidrogénio (Wikipédia, 2016b).....	17
Figura 1.7 – Propriedades afetadas dos artigos têxteis com a inclusão da nanotecnologia na indústria têxtil (Marques, 2015).....	19
Figura 2.1 – Esquema representativo das diluições sequenciais a realizar de modo a obter uma concentração celular final de $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$	37
Figura 3.1 – Cromatogramas obtidos na otimização do método de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução	42
Figura 3.2 – Retas de calibração obtidas com a solução de TPP 0,01 M.....	43
Figura 3.3 – Cromatograma obtido na otimização do método de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução. Cromatograma referente à concentração de $330 \mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2	43
Figura 3.4 – Representação gráfica das áreas dos picos de TPPO obtidos por cromatografia líquida de alta resolução em cada amostra	45
Figura 3.5 – Representação gráfica da concentração de H_2O_2 em solução ao longo do tempo.....	46
Figura 3.6 – Representação gráfica da concentração de H_2O_2 retido no filtro.....	47
Figura 3.7 – Percentagem de H_2O_2 (m/m) presente nas amostras têxteis, obtida por titulação.....	49

Figura 3.8 – Resultados obtidos por MEV para amostras aplicadas por esgotamento.....	51
Figura 3.9 – Resultados obtidos por MEV para amostras aplicadas por impregnação.....	52
Figura 3.10 – Resultados obtidos no teste qualitativo das amostras funcionalizadas por esgotamento.....	54
Figura 3.11 – Resultados obtidos no teste qualitativo das amostras funcionalizadas por impregnação.....	55
Figura 3.12 - Média do logaritmo do número de UFCs por mL em cada amostra testada nos três ensaios independentes realizados com as amostras tratadas por esgotamento com 0 (0L) e 10 lavagens (10L).....	57
Figura 3.13 – Média do logaritmo do número de UFCs por mL em cada amostra testada nos três ensaios independentes realizados com as amostras tratadas por impregnação com 0 (0L) e 5 lavagens (5L).....	58

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Tipos de agentes antimicrobianos e a sua ação sobre os microrganismos (Adaptado de Soutinho, 2006).....	12
Tabela 1.2 – Exemplos de agentes antimicrobianos de origem sintética e natural e a sua principal função no combate aos microrganismos (NEBM, 2016).....	14
Tabela 2.1 – Gradiente de concentrações dos solventes, H ₂ O e ACN, da fase móvel (FM) para a estabilização da coluna no sistema de cromatografia líquida de alta resolução	28
Tabela 2.2 – Condições das amostras sem nanopartículas retiradas para análise por cromatografia líquida de alta resolução e iodometria.....	31
Tabela 2.3 – Condições das amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica retiradas para análise por cromatografia líquida de alta resolução e iodometria.....	32
Tabela 2.4 – Amostras têxteis utilizadas nos métodos de caracterização dos têxteis funcionalizados por esgotamento e impregnação.....	33
Tabela 2.5 – Amostras têxteis sujeitas a ciclos de lavagens utilizadas nos métodos de caracterização dos têxteis funcionalizados por esgotamento com 10 lavagens e por impregnação com 5 lavagens.....	34
Tabela 3.1 – Resultados obtidos após a titulação das soluções com concentrações entre 4 e 495 µg mL ⁻¹ de H ₂ O ₂	44
Tabela 3.2 – Teores de retenção de H ₂ O ₂ nas nanopartículas de sílica para a iodometria e para o cromatografia líquida de alta resolução, para as amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica após uma e duas horas de agitação.....	48
Tabela 3.3 – Resultados médios obtidos no teste qualitativo para as amostras testadas pelo teste do halo.....	56

Capítulo I – Introdução

1 – Enquadramento/motivação e objetivos

1.1 – Enquadramento/motivação

Os materiais têxteis têm acompanhado a evolução da cultura humana, estando associados ao desenvolvimento artístico e tecnológico. Nos últimos anos, a preocupação com a higiene pessoal e saúde pública, tornaram importante o combate a fatores inerentes aos materiais têxteis como o odor e contaminações microbianas (O'Brien et al., 2002). Tais preocupações geraram uma elevada procura de têxteis antimicrobianos. Estes têxteis apresentam características melhoradas como o toque, conforto e higiene. São exemplos de têxteis funcionais: têxteis termorreguladores, têxteis antimicrobianos, têxteis impermeáveis e transpiráveis e camisolas com proteção UV (Trophicolor, 2016a). As propriedades adicionais conferidas aos materiais antimicrobianos permitem o controlo do crescimento e propagação de microrganismos, consequentemente, reduzir e controlar odores e manchas, reduzir o risco de infeções, evitar a propagação de doenças e controlar a deterioração dos têxteis. Os tratamentos antimicrobianos podem ser aplicados ao vestuário usual e/ou desportivo, roupa interior, meias, vestuário de trabalho, roupa de cama e forros de colchões. O interesse neste tipo de têxteis funcionais centra-se na terapia, prevenção e apoio na dermatologia com partículas que não sejam nocivas para a pele (Kumar, 2014; Success Gadget, 2016).

Com a evolução da tecnologia e com o aparecimento de novos materiais, surgiu a necessidade de criar têxteis com a capacidade de manter o efeito antimicrobiano por muito tempo e com resistência ao maior número de lavagens possível. Deste pressuposto apostou-se no encapsulamento dos agentes antimicrobianos em nanopartículas. A incorporação de nanopartículas em acabamentos têxteis permite assim uma melhoria na funcionalização permanente e efetiva dos substratos, sem alteração das macropropriedades dos têxteis tais como a textura e a respirabilidade (Gomes, 2013).

1.2 – Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo do encapsulamento de peróxido de hidrogénio em nanopartículas de sílica, avaliando o seu efeito na atividade do agente antimicrobiano.

Este trabalho teve como objetivos mais específicos os seguintes pontos:

- Desenvolvimento e otimização de um método de quantificação de peróxido de hidrogénio por cromatografia líquida de alta resolução;
- Avaliação da capacidade de encapsulamento do peróxido de hidrogénio em nanopartículas de sílica por iodometria e por cromatografia líquida de alta resolução;
- Caracterização físico-química do complexo nanopartículas de sílica – peróxido de hidrogénio aplicado a um substrato têxtil caracterizado por microscopia de varrimento (MEV);
- Quantificação do peróxido de hidrogénio presente no têxtil por titulação iodométrica;
- Avaliação do material têxtil em termos de atividade antimicrobiana, com base no método do halo e no método de absorção proposto pela norma JIS L 1902:2008;
- Estudo da resistência do acabamento antimicrobiano a lavagens.

1.3 – A empresa

A Empresa *Success Gadget*, Nanotecnologia e Novos Materiais, Lda é uma empresa sediada em Barcelos, pioneira no desenvolvimento de têxteis biofuncionais utilizando a nanotecnologia na produção de vestuário funcional e inteligente capaz de oferecer um desempenho e conforto inigualáveis. Entre os produtos desenvolvidos pela empresa, destacam-se as soluções de repelência de insetos e soluções antimicrobianas de longa duração.

A tecnologia Sil2U foi uma tecnologia única desenvolvida pela *Success Gadget*, Nanotecnologia e Novos Materiais, Lda que permite a funcionalização de vários materiais como têxteis, tintas, calçado, entre outras que podem ser aplicados em diferentes setores e mercados, dependendo da necessidade do cliente.

2 – Têxteis

As fibras têxteis estão fortemente associadas ao cotidiano e à qualidade de vida humana, tendo um papel dominante na economia mundial. O fabrico de um artigo têxtil inicia-se com a seleção da matéria-prima fibrosa que deve possuir propriedades específicas tais como: serem filiformes, flexíveis, finos e de elevado comprimento em relação à dimensão transversal máxima (Trophicolor, 2016a). Deste modo, é fundamental conhecer as propriedades morfológicas, químicas e físicas destes materiais, para que a sua seleção seja adequada à utilização do artigo têxtil. Para além disso, as propriedades específicas também definem o tipo de equipamento, tratamentos e processos a utilizar para a sua transformação. As fibras podem ser de origem natural, sintéticas ou artificiais (Vieira, 2006).

2.1 – Fibras têxteis

Naturais: As fibras naturais provêm da natureza com uma forma natural apta para o processamento têxtil. Podem ser de origem vegetal, como por exemplo, o algodão, o linho e a fibra de coco; de origem animal, como a seda e a lã e de origem mineral, como o amianto (Trophicolor, 2016a).

Artificiais: As fibras artificiais são produzidas por processos industriais e obtidas a partir de produtos naturais como a viscose e o acetato que posteriormente são transformados por ação de produtos químicos (Trophicolor, 2016a).

Sintéticas: As fibras sintéticas são produzidas por processos industriais e obtidas por síntese química a partir de polímeros de natureza orgânica, como o poliéster, o elastano e a poliamida ou a partir de polímeros de origem inorgânica como o vidro e o carbono (Trophicolor, 2016a).

Uma das fibras naturais mais utilizadas é o algodão, que é utilizado como fibra têxtil desde os primórdios do vestuário e da evolução da produção de artigos têxteis (O'Brien *et al.* 2002).

2.2 – Algodão

O algodão é a fibra natural vegetal mais importante para a indústria têxtil e é utilizado há mais de 7000 anos. Segundo a Diretiva 96/74/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 1996 relativa às denominações têxteis, o algodão é definido como uma “fibra proveniente da semente do algodoeiro” (Género *Gossypium*) (CEE, 1982) (Figura 1.1).



Figura 1.1 - Algodão em cru (DB algodão, 2016)

O algodão é utilizado pela indústria sob a forma de fios, fibras, tecidos e roupas, sendo que a sua principal utilização é a produção de tecidos. Os tecidos de algodão podem ser encontrados em produtos têxteis-lar, médico-cirúrgicos, roupas desportivas, formais, interiores e usuais (Magalhães, 2015). A fibra de algodão possui características como: toque agradável, hipoalergénico, grande capacidade de absorção, boa resistência a lavagens, agressões físicas e ambientais, fácil tingimento, não é suscetível à formação de *pilling* (Medeiros, 2016) e é biodegradável (Oliveira, 1997).

A fibra de algodão é constituída por três camadas: a parede primária, a parede secundária e o lúmen, tal como se pode verificar na Figura 1.2.

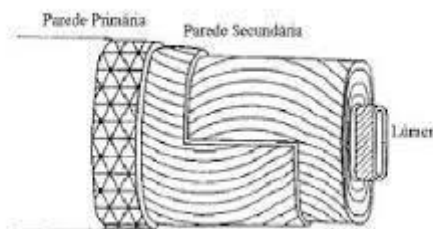


Figura 1.2 - Estrutura do algodão (Machado *et al.*, 2008).

A maturação do algodão está dividida em duas fases distintas que contribuem para a sua formação e desenvolvimento. A primeira fase diz respeito à floração seguida do ciclo de desenvolvimento das fibras. Durante esta fase inicial a fibra atinge o seu comprimento máximo, sendo constituída maioritariamente por celulose. Na segunda fase ocorre a maturação da cápsula e há a formação de uma parede no interior da parede primária (celulósica) formada na fase anterior. A parede formada nesta fase sofre um espessamento rápido devido ao depósito de celulose em camadas. O engrossamento termina poucos dias antes do rebentamento da cápsula e consequente libertação das fibras de algodão. É a parede secundária que define características como a resistência e fiabilidade do algodão. No final da maturação, a fibra começa a secar e perde a sua forma inicial, começando a ficar espalmada e a torcer-se sobre o seu próprio eixo (Vieira, 2006).

Para além das fibras de algodão em cru serem compostas maioritariamente por celulose (90 a 95%), estas englobam na sua composição proteínas, compostos inorgânicos, substâncias peptídicas, ácidos orgânicos, ceras, entre outros (Magalhães, 2015; Vieira, 2006).

A celulose (Figura 1.3) é um polissacarídeo cuja fórmula molecular é $(C_6H_{10}O_5)_n$ e por hidrólise origina monómeros de glucose.

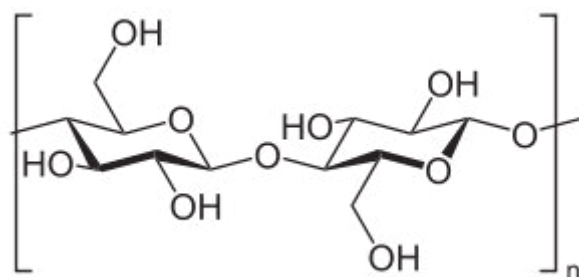


Figura 1.3 - Fórmula química da celulose (Wikipédia, 2016a).

A sua origem vegetal torna o algodão mais suscetível a ataques microbianos, uma vez que apresenta uma estrutura porosa e hidrofílica capaz de reter elementos como a água, oxigénio e nutrientes. Assim, o algodão proporciona o ambiente ideal para a proliferação de bactérias e fungos (Magalhães, 2015).

As fibras naturais são as mais suscetíveis de contaminação microbiológica, no entanto, as fibras sintéticas, apesar de apresentarem propriedades hidrofóbicas, não são totalmente imunes aos ataques microbianos (Blyskal, 2009; Szostak-Kotowa, 2004).

2.3 – Proliferação microbiana em têxteis

Os têxteis são um meio propício à propagação de microrganismos, uma vez que proporcionam um ambiente favorável para o seu desenvolvimento promovido pela retenção de nutrientes e humidade. Os materiais têxteis mais propícios à proliferação de microrganismos são as roupas interiores, roupas hospitalares, o calçado e roupas de desporto, uma vez que estão expostas a humidade e calor (Magalhães, 2015).

Dos inúmeros microrganismos existentes na Terra, as bactérias são aquelas que ocupam um lugar de destaque, quer pela elevada diversidade metabólica quer pela versatilidade da sua interação com os seres vivos. As bactérias são seres microscópicos com um tamanho na ordem dos micrómetros e que possuem uma molécula de ADN. Estas possuem morfologias diversas que caracterizam a sua denominação. As morfologias mais comuns são as esféricas (cocos), alongadas (bacilos) ou espiriladas (espirilos) (Ferreira *et al.*, 2010).

A distinção entre bactérias pode ser feita com base nas características de crescimento em diferentes meios nutritivos, pelas características das colónias como o tamanho, a cor, o cheiro e a sua forma. Existem ainda aspetos mais técnicos que possibilitam a diferenciação das diferentes bactérias, como a capacidade de resistir a antibióticos, de fermentar açúcares específicos (Abreu, 2004).

A capacidade de reter o corante Gram permite, também, caracterizar as bactérias quanto à estrutura da parede celular. A coloração de Gram baseia-se na permeabilidade celular, sendo que esta é menor nas bactérias Gram positivas (Gram +).

As bactérias Gram + possuem uma parede celular constituída por uma camada contínua de peptidoglicano, tornando-as menos permeáveis. Devido à constituição da parede, o complexo violeta/iodo utilizado na coloração de Gram fica retido no interior das células, conferindo-lhes uma coloração azul. A composição da parede celular das

bactérias Gram + traduz uma maior resistência a agentes antimicrobianos (Abreu, 2004).

Contrariamente, as bactérias Gram negativas (Gram –) possuem um invólucro descontínuo constituído por uma camada fina de peptidoglicano e uma camada exterior. São por isso mais permeáveis a compostos químicos. Pelo que justifica a coloração de Gram final em tons vermelho, pois o complexo violeta/iodo é facilmente extraído das células com o auxílio de um descolorante, permitindo, assim, a admissão da safranina (Abreu, 2004).

Normalmente a pele de um indivíduo saudável tem bactérias comensais que controlam o crescimento de bactérias patogénicas. No entanto, quando o sistema imunitário sofre um desequilíbrio, as bactérias patogénicas conseguem proliferar e podem provocar infeções (Magalhães, 2015).

Os microrganismos mais comuns na pele dos seres humanos são *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Estes são frequentemente encontrados em roupas interiores, as bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermis* surgem no vestuário comum e interior e *Escherichia coli* encontra-se, sobretudo, em calças e roupa interior (CITEVE, 2008).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogénica, com forma esférica, Gram +, associada a infeções clínicas, desde infeções cutâneas simples a infeções severas, como por exemplo a pneumonia ou a septicemia. *S. aureus* é frequentemente encontrada na pele e fossas nasais de indivíduos saudáveis. A bactéria cresce em meio rico com pH aproximadamente neutro e a uma temperatura de 37 °C (Van Sorge *et al.*, 2013). A estirpe utilizada neste trabalho foi a *S. aureus* ATCC® 6538™, estirpe adequada ao estudo da eficácia antimicrobiana de compostos, de produtos desinfetantes, bactericidas e bacteriostáticos (Cepeda *et al.*, 2005; Kniehl *et al.*, 2005).

A proliferação de microrganismos nos materiais têxteis provoca perdas de resistência, assim como a descoloração e alteração do aspeto material, podendo levar à sua degradação. Para além dos problemas causados na fibra, a proliferação de microrganismos apresenta, também, inconvenientes ao utilizador. Pois, os microrganismos metabolizam compostos como a urina e o suor, o que conduz à libertação de maus odores, desencadeamento de irritações ou mesmo infeções. É o

caso da bactéria *S. aureus* que é responsável pela formação do composto 3-metil-2-hexenoico responsável pelo odor a suor no ser humano (Esteves, 2009).

O contacto direto da pele infetada com materiais têxteis como meias, toalhas, sapatos e roupa de cama torna-se um meio de proliferação de microrganismos (Magalhães, 2015). Em ambientes hospitalares, os materiais têxteis são uma das principais vias de proliferação de microrganismos e de transferência de agentes patogénicos responsáveis por infeções potencialmente fatais (Kim *et al.*, 2001). Assim, os materiais têxteis com acabamentos antimicrobianos revelaram-se importantes no setor doméstico e hospitalar, de modo a prevenir a propagação de doenças e a deterioração dos têxteis.

3 – Acabamentos têxteis

O acabamento de artigos têxteis tem o propósito de conferir aos mesmos propriedades e características adicionais quer a nível estético quer a nível funcional, de modo a satisfazer as necessidades do mercado.

A aplicação de acabamentos permite ainda a adição ou melhoria de propriedades tais como o brilho, o toque, a resistência a fatores exteriores e o amarrotamento, de modo a criar efeitos e características inovadoras nos artigos têxteis do ponto de vista industrial e comercial (Maria *et al.*, 2008). Os acabamentos têxteis são divididos em dois tipos: os acabamentos mecânicos e os acabamentos químicos.

3.1 Acabamentos mecânicos

Os acabamentos mecânicos modificam o aspeto e as propriedades dos têxteis, através de operações mecânicas, como a compactação, a cardação, a laminagem, entre outros (Maria *et al.*, 2008; Troficolor, 2008).

3.2 Acabamentos químicos

Os acabamentos químicos consistem na aplicação de produtos químicos nos substratos têxteis, que visam a valorização estética do produto têxtil, conforto, conservação, proteção e limpeza do mesmo (Marques, 2015). Para além disso, permitem a eliminação de substâncias, tais como impurezas, sujidade e poeiras e a reconstituição de características perdidas durante tratamentos como fervura e branqueamento. São exemplos de acabamentos químicos o tingimento, amaciamento, acabamentos especiais, tais como os antimicrobianos, hidrofóbicos e autolimpeza. A incorporação destes acabamentos nas fibras têxteis é feita maioritariamente por esgotamento ou impregnação.

3.2.1 Esgotamento

No processo descontínuo ou esgotamento o processamento dos materiais têxteis é feito por imersão num banho com o acabamento a aplicar, no qual o material têxtil permanece durante um determinado período de tempo. Neste processo, mais

especificamente no processo da incorporação de agentes antimicrobianos, estes são fixados às fibras têxteis durante a imersão no banho. Deste modo, deve haver contacto frequente entre o banho e as fibras têxteis por meio de movimentação do banho (Costa, 2014).

No esgotamento é necessário considerar 5 etapas: a uniformização do princípio ativo no banho (1), a sua difusão no banho (2), a capacidade de absorção superficial da fibra (3), a difusão (4) e fixação do acabamento nas fibras (5) (Figura 1.4). Para que estas etapas sejam processadas em conformidade é essencial que haja agitação mecânica, temperatura e produtos auxiliares de dispersão adequados ao princípio ativo e às fibras (CITEVE, 2012).

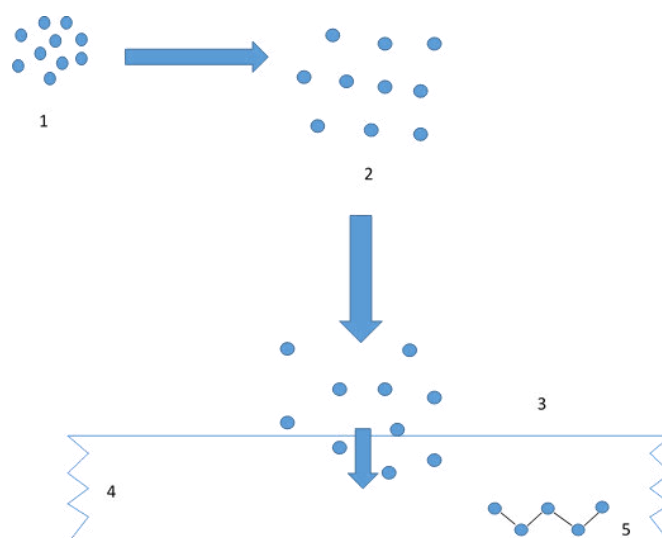


Figura 1.4- Esquema representativo das etapas do processo de esgotamento (Adaptado de Costa, 2014). (1) Uniformização do princípio ativo no banho; (2) Difusão do princípio ativo no banho; (3) Absorção do princípio ativo pela superfície das fibras; (4) Difusão nas fibras têxteis; (5) Fixação do princípio ativo nas fibras têxteis.

3.2.2 Impregnação

No processo contínuo ou impregnação, o banho permanece em estado estacionário enquanto o tecido passa continuamente por ele [Figura 1.5 (1)]. Depois de passar pelo banho, o tecido é espremido por um sistema de cilindros (*Foulard*) [Figura 1.5 (2)] e seco a altas temperaturas, sendo posteriormente enrolado

(Broadbent, 2001; Ingamells, 1993), tal como está representado no esquema da Figura 1.5.

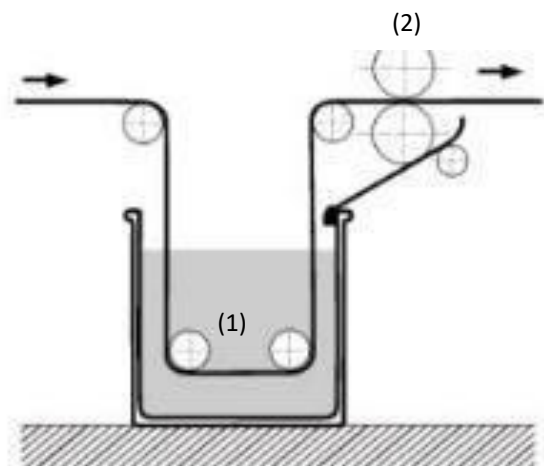


Figura 1.5 - Esquema representativo da aplicação do princípio ativo no tecido por impregnação (Adaptado de Neto, (2016)).

Tal como no esgotamento é necessário ter em consideração certas etapas para que o processo ocorra em conformidade, tais como:

- 1- Aplicação do princípio ativo por impregnação nas fibras;
- 2- Fixação do princípio ativo por calor seco ou vapor nas fibras;
- 3- Secagem/fixação do princípio ativo por cilindros aquecidos por vapor (CITEVE, 2012; Sá, 2008).

Comparativamente ao esgotamento, o processo de impregnação tem a vantagem de poder ser aplicado a grandes quantidades de material têxtil num tempo mais reduzido, pois evita que a produção dependa da imersão dos tecidos em banhos com o princípio ativo, uma vez que a fixação do mesmo é forçada através da passagem entre cilindros (Sánchez *et al.*, 1981). No entanto, a limitação da aplicação de acabamentos por esgotamento é o tempo do processo, pois é um processo moroso, em comparação à impregnação.

3.3 Acabamentos antimicrobianos

De modo a contornar os problemas causados pela proliferação de microrganismos nos materiais têxteis, a indústria desenvolveu acabamentos antimicrobianos. Os acabamentos antimicrobianos conferem uma proteção aos

consumidores de microrganismos patogénicos ou causadores de odores desagradáveis e a proteção do próprio têxtil a danos causados por diferentes microrganismos (Magalhães, 2015).

3.3.1 Agentes antimicrobianos

A Tabela 1.1 apresenta os diversos tipos de agentes antimicrobianos existentes e a sua ação sobre os microrganismos.

Tabela 1.1- Tipos de agentes antimicrobianos e a sua ação sobre os microrganismos (Adaptado de Soutinho, 2006)

Agente antimicrobiano	Ação antimicrobiana	
Desinfetante	Desinfeta materiais não vivos, destruindo a população microbiana	
Antisséptico	Desinfeta tecidos animais, destruindo ou inibindo a proliferação microbiana	
-cida	Germicida	Elimina por morte
	Bactericida	
	Fungicida	
	Algicida	
	Viricida	
-stático	Bacteriostático	Impede o crescimento
	Fungistático	

A maioria dos microrganismos patogénicos encontrados na pele apresentam uma taxa de crescimento microbiano, rápida em condições ideais, tais como temperaturas entre os 36 e os 40 °C e pH entre 5 e 9. Assim, os acabamentos antimicrobianos devem ter uma ação rápida sobre os microrganismos, para serem eficazes. Além da ação rápida, um têxtil antimicrobiano necessita de cumprir os seguintes requisitos: capacidade de prevenir o crescimento de microrganismos ou eliminar os mesmos, não provocar efeitos nocivos aos utilizadores; ter resistência a fluídos corporais e desinfetantes, ter impacto ambiental mínimo; manter a sua atividade antimicrobiana ao longo de ciclos de lavagem, limpeza, engomagem e

exposição a agentes ambientais externos, fácil aplicação na indústria têxtil, baixo custo e compatibilidade com outros processos de acabamento industrial e, por fim, não provocar a deterioração da qualidade e das propriedades do tecido (Kumar, 2014; Schindler *et al.*, 2004).

Os agentes antimicrobianos aplicados aos têxteis podem ser difusos ou não difusos. Um agente difuso encontra-se adsorvido nas fibras têxteis e tem a capacidade de migrar da superfície do tecido ou do interior da fibra para o meio envolvente. Estes agentes conseguem ser eficazes tanto na superfície da fibra como no meio envolvente. No entanto, apresentam algumas limitações, como por exemplo: baixa durabilidade e a possibilidade de entrar em contacto com a pele, afetando a flora microbiana ou até mesmo penetrar a barreira da pele e potenciar irritações cutâneas. Este contacto direto dos agentes antimicrobianos difusos com os microrganismos presentes na pele humana pode promover o desenvolvimento de resistências, comprometendo a sua ação antimicrobiana (CITEVE, 2008). Os agentes não difusos encontram-se ligados quimicamente às fibras, atuando apenas na superfície das fibras têxteis. Por estarem quimicamente ligados à fibra, este género de agentes antimicrobianos potencia uma maior resistência a lavagens e consequentemente uma maior durabilidade da ação antimicrobiana (Magalhães, 2015; Schindler *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos aplicados na indústria têxtil centra-se essencialmente no controlo do crescimento microbiano pela prevenção da reprodução celular, o bloqueio de enzimas, reação de iões com a membrana celular, causando a destruição das paredes celulares e a morte dos microrganismos. A ação dos mesmos é influenciada pela natureza e concentração do agente antimicrobiano, pelo tipo de têxtil e método de incorporação (ECHA, 2016; Magalhães, 2015).

Existem vários tipos de agentes antimicrobianos sintéticos e naturais com diversas aplicações em diferentes áreas. Além da indústria têxtil são exemplos a indústria produtora de plásticos, madeira e metalúrgica.

A Tabela 1.2 apresenta alguns agentes antimicrobianos de origem sintética e natural e a sua principal função no combate ao crescimento microbiano.

Tabela 1.2 - Exemplos de agentes antimicrobianos de origem sintética e natural e a sua principal função no combate aos microrganismos (NEBM, 2016)

	Agentes antimicrobianos	Função
Químicos	Álcoois e compostos fenólicos	Possuem características desinfetantes
	Halogéneos (iodo e compostos iodados, cloro e compostos clorados)	Funcionam como agentes oxidantes de constituintes celulares, causando a sua inativação
	Compostos quaternários de amónia	Utilizados especialmente em detergentes, atuando como desinfetantes, amaciadores e acabamentos antimicrobianos
Naturais	Fenólicos	Responsáveis pela inativação de enzimas, degradação de membranas, privação de substrato;
	Aminoácidos (sericina e cisteína)	Reagem entre os grupos tiol, presentes na membrana das bactérias e as fibras têxteis
	Quitosato (obtido a partir de cascas de camarão e crustáceos)	Alteração da superfície das células e da sua permeabilidade, induzindo a dispersão das substâncias intracelulares. Apresenta vantagens como a biodegradabilidade e a biocompatibilidade. Confere resistência ao encolhimento dos materiais têxteis.

As plantas são uma das principais fontes de agentes antimicrobianos naturais, são exemplos disso *Aloe vera*, óleo de eucalipto e de tomilho. Os produtos de origem natural apresentam menor propensão a causarem reações adversas quando comparados com os compostos sintéticos e apresentam baixo custo. Num estudo realizado com *Aloe vera* aplicado em algodão por esgotamento, verificou-se que este antimicrobiano natural apresentava atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, mesmo após 50 ciclos de lavagens (Stefanović *et al.*, 2012).

O mercado têxtil engloba uma série de materiais funcionalizados com alguns dos agentes antimicrobianos anteriormente referidos.

O polihexametileno de biguanida (PHMB) é um agente antimicrobiano com atividade biocida aplicado em fibras naturais como o algodão e a lã, para a eliminação de bactérias e fungos (Shahidi *et al.*, 2012). Também é utilizado em pensos rápidos como antisséptico (Ristić *et al.*, 2011).

Os sais metálicos, para além de desempenharem a sua função corante, possuem propriedades antimicrobianas, permitindo que os materiais têxteis sejam funcionalizados e tingidos numa só aplicação. As nanopartículas de prata, por exemplo, são aplicáveis em têxteis como algodão, lã, seda, *nylon* e poliéster (Magalhães, 2015).

4 – Peróxido de hidrogénio

A empresa EVONIK *industries* define o peróxido de hidrogénio como sendo “um produto químico ambientalmente correto” (Evonik industries, 2016). Este é usado nas reações de oxidação nos processos de branqueamento, pelas indústrias de celulose, papel, têxtil, bem como no tratamento de efluentes. A fórmula [Figura 1.6 (a)] e a estrutura química [Figura 1.6 (b)] deste composto são apresentadas na Figura 1.6.

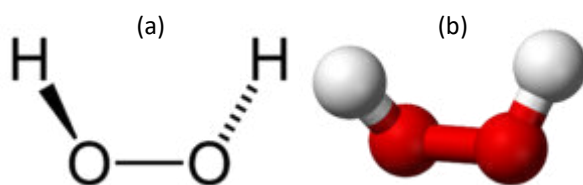


Figura 1.6 - (a) Fórmula química e (b) estrutura química da molécula de peróxido de hidrogénio (Wikipédia, 2016b).

O peróxido de hidrogénio resultante da reação é purificado, concentrado e estabilizado adequadamente para ser comercializado como solução aquosa, geralmente em concentrações de 35, 50, 60, 70 % (m/m) (Evonik industries, 2016).

A estabilidade das soluções de peróxido de hidrogénio é influenciada pela temperatura, sendo que o aumento da temperatura promove a sua decomposição (em oxigénio e água); pelo valor do pH que aumenta como consequência do aumento da temperatura e pela presença de impurezas com efeito de decomposição. Segundo a empresa produtora de peróxido de hidrogénio (Evonik industries, 2016), o pH ideal para a estabilidade das soluções é de 4,5. A degradação deste composto é agravada quando as soluções adquirem um valor de pH superior a 5 (Evonik industries, 2016).

Para além da temperatura e do pH, a degradação do peróxido de hidrogénio também pode ser induzida pela presença de metais pesados (iões catalíticos) e de enzimas como as catálases. Sendo um composto fotossensível, o peróxido de hidrogénio pode também ser decomposto com a exposição direta à luz solar. Este agente antimicrobiano é definido como sendo um dos produtos químicos mais limpos e versáteis com aplicabilidade em várias indústrias (Evonik industries, 2016).

O peróxido de hidrogénio atua sobre os microrganismos causando a desnaturação proteica e a rutura da permeabilidade da membrana celular. A sua capacidade antimicrobiana depende do tempo de contacto com os microrganismos, da temperatura à qual ocorre a reação e da concentração do mesmo (Pinto *et al.*, 2010).

5 – Nanopartículas de sílica

A indústria têxtil, devido à crescente necessidade de desenvolvimento de novos produtos químicos, foi um dos setores primordiais na implementação da nanotecnologia, promovendo a funcionalização de artigos têxteis. Com a inclusão da nanotecnologia na indústria têxtil algumas propriedades dos tecidos foram afetadas, tal como apresenta a Figura 1.7 (Marques, 2015).

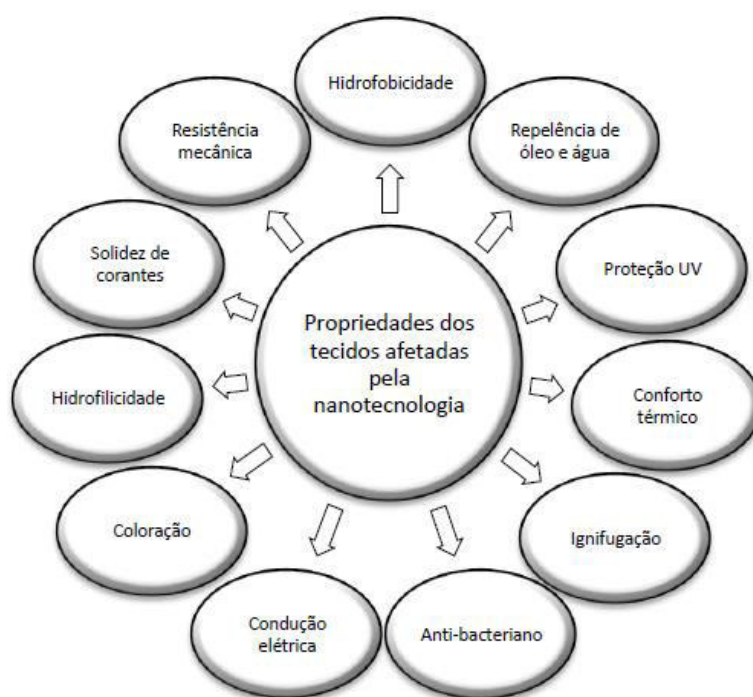


Figura 1.7 - Propriedades afetadas dos artigos têxteis com a inclusão da nanotecnologia na indústria têxtil (Marques, 2015).

Do desenvolvimento nanotecnológico surgem as nanopartículas, que permitem a incorporação dos vários tipos de acabamentos. Estas podem ser incorporadas em fibras e revestimentos, conferindo-lhes propriedades funcionais, tais como antimicrobianas, retardadoras de chama, melhorias no conforto, textura e aparência dos artigos têxteis (Zille, 2011).

A nanotecnologia é uma tecnologia galopante em termos de conhecimento e desenvolvimento, de tal modo que atualmente existe no mercado europeu uma grande variedade de produtos compostos por nanomateriais. Atualmente, o mercado nanotecnológico é composto por produtos como revestimentos, vestuário

antimicrobiano e produtos cosméticos (Agência Europeia de Produtos Químicos - ECHA).

Segundo a ECHA (2016), “os nanomateriais são substâncias ou materiais químicos fabricados e utilizados numa escala muito pequena. As suas estruturas variam entre 1 a 100 nanómetros pelo menos numa dimensão.”

A utilização da nanotecnologia na indústria têxtil permitiu a multifuncionalização dos materiais, dando origem a materiais inovadores. Os acabamentos multifuncionais à escala nano, como antimicrobianos, proteção UV e retardamento da chama resultam da combinação de princípios ativos com nanopartículas orgânicas ou não orgânicas. Certas nanopartículas multifuncionais utilizadas na indústria têxtil não se ligam diretamente aos substratos têxteis, tornando-se necessário encontrar soluções que não modifiquem as propriedades macroscópicas das fibras têxteis, como por exemplo, o toque (Ventura *et al.*, 2011).

Segundo Ventura *et al.* (2011), as primeiras aplicações comerciais de acabamentos com dimensões nanométricas na indústria têxtil foram concretizadas com base num processo de aplicação de um acabamento têxtil comum. Contudo, devido à falta de ligação entre as nanopartículas e o princípio ativo, os nanoacabamentos acabaram por não subsistir a lavagens. Desse modo, foi necessário garantir a otimização das ligações entre as nanopartículas e a superfície das fibras têxteis, para garantir a durabilidade do acabamento e por questões ecológicas, prevenir a libertação das mesmas para o meio ambiente (Ventura *et al.*, 2011).

Os nanomateriais possuem propriedades físico-químicas que os diferem dos macromateriais. Contudo, estes podem apresentar desvantagens a nível ambiental, saúde e segurança do consumidor (ECHA, 2016).

A encapsulação compreende a incorporação ou dispersão de compostos ativos, proporcionando a proteção dos mesmos contra a degradação por agentes ambientais como o pH, a temperatura e sais e/ou solventes orgânicos. Esse processo pode conferir, ainda, uma melhoria da estabilidade e solubilidade do princípio ativo a encapsular. A retenção dos compostos ativos nas nanopartículas é influenciada por características químicas como a solubilidade, polaridade e volatilidade (Freixo, 2013). A eficácia do complexo pode ser influenciada por fatores como: a natureza do material transportador, a dimensão e a porosidade (Cabral *et al.*, 2003).

A sílica (SiO_2) é um composto químico com elevado interesse na área têxtil, porque possui elevada porosidade, o que permite a incorporação e libertação de determinados compostos químicos de forma controlada. Para além disso, é um composto inócuo e não prejudicial à saúde humana (Schindler *et al.*, 2004). Estas apresentam características particulares como elevada área superficial, elevada porosidade, biocompatibilidade e estabilidade química e térmica. Outra característica interessante das partículas à escala nano é a capacidade de formar sistemas híbridos, nos quais é possível adicionar princípios ativos com diversas aplicações, como por exemplo, a combinação de agentes antimicrobianos com sílica. Tais características potenciam uma maior durabilidade e eficácia dos acabamentos têxteis (Gomes, 2013). No entanto, devido à sua elevada densidade, as nanopartículas de sílica têm tendência a sedimentar, o que se revela uma desvantagem em relação à sua utilização, uma vez que dificulta a sua dispersão em meio líquido (Zhang *et al.*, 2009)

Assim, a utilização de nanopartículas de sílica para incorporação dos agentes antimicrobianos, permite a libertação controlada dos mesmos nos têxteis funcionalizados protegendo-os da degradação causada por fatores ambientais, aumentando o interesse biotecnológico destes produtos em várias áreas (Cabral *et al.*, 2003; Gomes, 2013).

6 – Metodologias

6.1 – Métodos químicos

A quantificação de peróxido de hidrogénio é possível através de métodos baseados em técnicas como volumetria, espectrofotometria, eletroquímica e cromatografia (HPLC – cromatografia líquida de alta resolução ou GC – cromatografia gasosa). A quantificação pode ser obtida diretamente através de reações de oxidação-redução ou a partir da adição de compostos intermédios com coloração, como é o caso da iodometria (Gimeno *et al.*, 2015).

6.1.1 Cromatografia líquida de alta resolução

A cromatografia líquida de alta resolução é um método analítico utilizado para quantificar compostos químicos numa amostra. A técnica é rápida e com grande poder de resolução, de fácil funcionamento, simples e permite a análise de pequenos volumes de amostra. A separação dos compostos é potenciada por um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas presentes na amostra (soluto) e duas fases, a fase móvel (solvente) e a fase estacionária (coluna cromatográfica). A separação ocorre através da migração da amostra ao longo da fase estacionária por intermédio da fase móvel (Chust, 1990).

Os graus de afinidade das moléculas com as duas fases são definidos pela sua estrutura e grupos funcionais. Com tal, a velocidade de migração dos compostos da amostra é diferente, permitindo a separação cromatográfica das mesmas. A substância com menor afinidade com a fase estacionária é a primeira a ser eluída, pelo que a de maior afinidade fica retida na coluna durante mais tempo, apresentando uma menor velocidade de migração. À medida que os componentes saem da coluna, são detetados pelo detetor, que emite um sinal elétrico que é registado (Chust, 1990).

A quantificação de peróxido de hidrogénio por métodos cromatográficos pode ser feita por cromatografia líquida de alta resolução através de diferentes tipos de deteção. São exemplos de técnicas de quantificação de peróxido de hidrogénio por cromatografia líquida de alta resolução a reação do peróxido de hidrogénio com o iodeto na presença de molibdato de amónia e ácido vanílico da qual resulta a

formação do ácido iodovanílico que é quantificado por cromatografia líquida de alta resolução com detecção *diodo-array* e a reação de oxidação da trifenilfosfina (TPP) em trifenilfosfina oxidada (TPPO), promovida pela presença de peróxido de hidrogénio (Gimeno et al., 2015). Existe ainda a quantificação com detecção eletroquímica e com detecção de fluorescência. A quantificação de peróxido de hidrogénio com detecção de fluorescência é realizada com base na sua participação na reação de oxidação do ácido p-hidroxifenilacético catalisada por hemina, para a obtenção de um dímero com fluorescência. A detecção eletroquímica de peróxido de hidrogénio por cromatografia líquida de alta resolução é realizada com base na sua oxidação num elétrodo de ouro em comparação com um elétrodo de referência (Tarvina et al., 2010).

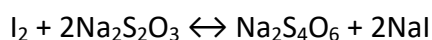
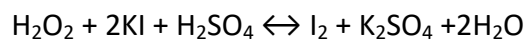
6.1.2 Titulação

A titulação é um método volumétrico que permite a determinação da concentração de uma solução com concentração desconhecida (titulado), utilizando uma solução de concentração conhecida (titulante). As duas soluções de natureza oposta reagem até atingirem o ponto de equivalência que é determinado com recurso, por exemplo, a um marcador, que muda de cor quando o ponto final é alcançado (Constantino et al., 2004).

Existem quatro tipos de titulações: ácido-base (adição de um ácido ou uma base a um a solução), de precipitação (formação de um precipitado), oxidação-redução (ocorre a transferência de eletrões entre o titulado e o titulante) e de complexação (doseamento de uma espécie química por formação de um composto estável) (Constantino et al., 2004).

No presente trabalho foi utilizada a iodometria (titulação por oxidação redução) para a quantificação do peróxido de hidrogénio. Esta consiste na oxidação do iodeto, presente na solução de iodeto de potássio, em iodo na presença de um catalisador de molibdato. O iodo formado na reação é titulado com tiosulfato de sódio. A reação de formação de iodo tem uma cor amarela que é intensificada com a adição do catalisador. O ponto final da reação ocorre quando a solução adquire uma coloração transparente (Constantino et al., 2004).

De acordo com Scott (1939):



6.2 – Métodos físicos

6.2.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A MEV é um instrumento de caracterização de materiais utilizada nas áreas de investigação e desenvolvimento. Segundo AJSC Monteiro (1982), os domínios desta técnica vão desde a caracterização de microestruturas de amostras (metais, cerâmicos, compósitos, biomateriais, revestimentos) até às aplicações nas áreas da geologia, medicina e biologia.

A tecnologia MEV funciona com base em feixes de eletrões, que quando incididos na superfície da amostra emitem sinais eletrónicos específicos. Sobre as amostras a analisar é percorrido um feixe de eletrões anteriormente acelerado por uma tensão variável entre os 0 e os 40 KV. A interação entre o feixe de eletrões e o material da amostra induz a emissão de radiação e eletrões. Os eletrões secundários emitidos sofrem excitação e libertam-se da superfície do material, permitindo a formulação da imagem da amostra (AJSC Monteiro, 1982).

As amostras a analisar por microscopia eletrónica de varrimento devem reunir algumas condições, para que o resultado obtido seja satisfatório. Estas devem apresentar uma superfície com boa condutividade elétrica, suportar vácuo, apresentar estabilidade química e física. Quando as amostras não são boas condutoras, é necessário proceder à sua metalização, aplicando um revestimento ultrafino (na ordem dos nanómetros) em ouro ou carbono (AJSC Monteiro, 1982).

6.3 – Métodos biológicos

A atividade antimicrobiana de materiais têxteis pode ser avaliada segundo os métodos descritos nas normas AATCC *Test Method* 147-2004, AATCC *Test Method* 100-2004 a ISO 20743 e a JIS L 1902.

A JIS L 1902:2008 foi a norma utilizada no presente trabalho. Esta norma engloba métodos qualitativos (teste do halo) e quantitativos (teste de absorção).

O teste do halo é um método que permite avaliar a atividade antimicrobiana de têxteis com acabamentos químicos antibacterianos com ou sem capacidade de difusão. Neste teste a ação antibacteriana é avaliada qualitativamente pelo tamanho do halo formado em torno da amostra, no caso de agentes antimicrobianos difusos, ou através da presença de atividade antibacteriana por baixo da amostra, para agentes antimicrobianos não difusos. Segundo Pinho *et al.* (2011), os métodos qualitativos de detecção de agentes antimicrobianos em têxteis funcionalizados são rápidos e eficazes.

O teste de absorção é realizado com o propósito de quantificar a atividade antibacteriana dos têxteis, através da determinação das atividades bacteriostática e bactericida. A sua quantificação baseia-se na determinação de unidades formadoras de colónias (UFCs) (Japanese Industrial Standard, 2008).

Para a determinação da atividade bacteriostática (inibição do crescimento microbiano), é necessária a realização de um processo qualitativo que demonstre claramente a atividade antibacteriana no têxtil. No entanto, se a atividade bactericida (morte microbiana) é expressa ou implícita, é necessária uma avaliação quantitativa, que providencia uma imagem clara para os possíveis usos dos materiais têxteis tratados.

Capítulo II – Materiais e métodos

1 – Desenvolvimento e otimização de um método de quantificação de peróxido de hidrogénio

1.1 – Quantificação por cromatografia líquida de alta resolução

O método de quantificação de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução foi otimizado tendo por base o método descrito por Gimeno *et al.* (2015). A quantificação do H_2O_2 foi determinada após a derivatização com TPP (0,01 e 0,02 M). Na preparação da solução de TPP 0,01 M e 0,02 M foram adicionados respetivamente, 104,8 mg e 209,6 mg de TPP a 40 mL de acetonitrilo (ACN) previamente filtrado. A fase móvel (FM) foi preparada pela mistura de água ultrapura (35 % v/v) e ACN (65 % v/v), sendo filtrada com um filtro de politetrafluoretileno (PTFE) (0,45 μm) e mantida 30 min no banho de ultrassons. A solução mãe (SM) de H_2O_2 com concentração inicial (37 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi preparada pela adição de 7,5 mL da solução comercial de H_2O_2 (500 000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a 92,5 mL de água ultrapura. Todas as soluções com H_2O_2 foram protegidas da luz e armazenadas no frigorífico a 4 °C, de modo a prevenir a degradação do princípio ativo.

Procedeu-se à preparação de uma solução padrão (SP) com uma concentração de 825 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 pela adição de 0,2 mL da SM a 9,8 mL de água ultrapura. De seguida foram preparados os padrões externos através da diluição da SP (825 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A gama de concentrações testadas neste trabalho foram 1, 4, 8, 17, 41, 62, 83, 124, 165, 248, 330, 413, 495 e 660 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para cada amostra a quantificar por cromatografia líquida de alta resolução, preparou-se uma solução constituída por 1 mL de amostra, 5 mL de ACN, 3 mL de água ultrapura e 1 mL da solução TPP (0,01 M ou 0,02 M). As soluções preparadas foram protegidas da luz e incubadas à temperatura ambiente durante 2 h. Após ocorrer a reação de derivatização, conservou-se as amostras até 24 h a 4 °C. Todas as amostras foram filtradas com um filtro de *nylon* (0,22 μm) e transferidas para um vial.

As amostras foram injetadas num sistema de cromatografia líquida de alta resolução - *Diodo array* utilizando uma coluna Nucleosil C18 Macherey-Nagel

(150 mm x 4,6 mm, 5 μ m, 100 Å, Merck). O sistema foi mantido a 25 °C, o volume de injeção foi de 10 μ L e o fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A coluna foi estabilizada seguindo o gradiente apresentado na Tabela 2.1. A leitura das amostras foi executada a um comprimento de onda de 225 nm.

Tabela 2.1 - Gradiente de concentrações dos solventes, H₂O e ACN, da fase móvel (FM) para a estabilização da coluna no sistema de cromatografia líquida de alta resolução

	Tempo (min)	H ₂ O (%) v/v	ACN (%) v/v
Gradiente de concentrações dos solventes	0,0	50	50
	5,5	50	50
	6,5	0	100
	9,0	0	100
	10,0	50	50
	20,0	50	50

Da leitura das amostras por cromatografia líquida de alta resolução, obtiveram-se as áreas dos picos de TPPO necessárias para a quantificação de H₂O₂ nas amostras. A relação entre a área dos picos obtidos para cada padrão externo e a concentração teórica das soluções permitiu construir a reta de calibração.

1.2 – Quantificação por iodometria

O método de quantificação de H₂O₂ por titulação utilizado neste trabalho foi fornecido pela empresa *Success Gadget*, Nanotecnologia e Novos Materiais, Lda. O princípio ativo foi quantificado após a reação do tiosulfato de sódio (0,1 N) (248,18 g mol⁻¹) com o produto de reação do H₂O₂ com o iodeto de potássio em meio ácido.

Na preparação da solução de tiosulfato de sódio (0,1 N) foram adicionadas 2,48 g de tiosulfato de sódio penta hidratado a 100 mL de água destilada. A solução catalisadora foi preparada pela dissolução de 9 g de molibdato de amónia em 10 mL de hidróxido de amónia (6 N), seguida da adição de 24 g de nitrato de amónia, perfazendo

com água destilada até um volume final de 100 mL. A solução de iodeto de potássio (1 % m/v) foi preparada pela adição de 1 g do mesmo a 100 mL de água destilada. Foram preparados os padrões externos a partir de diluições da SP (4, 41, 83, 330 e 495 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2).

A titulação foi executada do seguinte modo, pesou-se 10 g de amostra e adicionou-se 50 mL de água destilada, 10 mL de ácido sulfúrico (20 % v/v) e 10 mL de iodeto de potássio 1 % (m/v). A solução foi mantida sob agitação mecânica (400 min^{-1}) e adicionou-se 2 gotas de catalisador molibdato. Ainda sob agitação adicionou-se a solução de tiosulfato de sódio (0,1 N) com o auxílio de uma seringa até que a solução adquirisse uma coloração transparente, mantida pelo menos por 30 s.

Determinou-se o volume de tiosulfato de sódio (0,1 N) gasto na titulação, dividindo a diferença de peso da seringa (antes e após a titulação) pela densidade do tiosulfato de sódio (0,1 N) (1,01 g mL^{-1}). A percentagem de H_2O_2 titulado foi calculada com base na equação 2.1, em que % H_2O_2 (m/m) representa a percentagem mássica de H_2O_2 presente na amostra, $\Delta m_{\text{seringa}}$ a massa de tiosulfato de sódio (0,1 N) gasto na titulação (g), $d_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ a densidade do tiosulfato de sódio (0,1 N) (g mL^{-1}), d o fator de diluição e m_{amostra} a massa da amostra testada (g).

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ (m/m)} = \frac{\Delta m_{\text{seringa}} \times 0,1 \times 1,7}{m_{\text{amostra}} \times d_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Na equação 2.1, o valor 0,1 corresponde à normalidade da solução de tiosulfato de sódio e 1,7 corresponde à massa de H_2O_2 titulada por cada 1 mL de tiosulfato de sódio (0,1 N).

2 – Avaliação do encapsulamento de peróxido de hidrogénio por nanopartículas de sílica ao longo do tempo

2.1 – Preparação das amostras

Com o objetivo de avaliar o encapsulamento do H_2O_2 por nanopartículas de sílica ao longo do tempo, o princípio ativo foi quantificado em diferentes soluções por cromatografia líquida de alta resolução e por iodometria. Para tal preparou-se uma solução de H_2O_2 (SM com $37\,500\,\mu\text{g mL}^{-1}$) na qual foram misturadas 1 % (m/v) de nanopartículas. Colocou-se num frasco 50 mL de SM e noutro frasco 50 mL de SM com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica. Os dois recipientes foram envolvidos com papel de alumínio para minimizar a degradação do princípio ativo. As duas soluções foram submetidas a uma agitação mecânica de $400\,\text{min}^{-1}$ durante 2 h. Ao longo das duas horas, retiraram-se amostras com 5 mL de volume. A tabela 2.2 descreve as amostras sem nanopartículas obtidas nos tempos zero, uma e duas horas de agitação para análise por cromatografia líquida de alta resolução e iodometria.

Tabela 2.2 – Condições das amostras sem nanopartículas retiradas para análise por cromatografia líquida de alta resolução e iodometria

Solução sem nanopartículas	
D0	Amostra retirada no tempo T0h, sem agitação
D1	Amostra retirada após 1 h de agitação
D1 Filt	Filtração da amostra retirada após 1 h de agitação com um filtro PTFE (0,1 μm)
D1 Lav	3 lavagens consecutivas com 5 mL de água destilada do filtro utilizado na filtração da amostra D1 Filt
D2	Amostra retirada após 2 h de agitação
D2 Filt	Filtração da amostra retirada após 2 h de agitação com um filtro PTFE (0,1 μm)
D2 Lav	3 lavagens consecutivas com 5 mL de água destilada do filtro utilizado na filtração da amostra D2 Filt

A tabela 2.3 descreve as amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica obtidas nos tempos zero, uma e duas horas de agitação para análise por cromatografia líquida de alta resolução e iodometria.

Tabela 2.3 - Condições das amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica retiradas para análise por cromatografia líquida de alta resolução e iodometria

Solução com nanopartículas	
E0	Amostra retirada no tempo T0h, após breves segundos de agitação
E1	Amostra retirada após 1 h de agitação
E1 Filt	Filtração da amostra retirada após 1 h de agitação com um filtro PTFE (0,1 µm)
E1 Lav	3 lavagens consecutivas com 5 mL de água destilada do filtro utilizado na filtração da amostra E1 Filt
E2	Amostra retirada após 2 h de agitação
E2 Filt	Filtração da amostra retirada após 2 h de agitação com um filtro PTFE (0,1 µm)
E2 Lav	3 lavagens consecutivas com 5 mL de água destilada do filtro utilizado na filtração da amostra E2 Filt

2.2- Quantificação de peróxido de hidrogénio após encapsulamento

2.2.1 - Cromatografia líquida de alta resolução

As amostras a serem analisadas por cromatografia líquida de alta resolução (Tabelas 2.2 e 2.3), exceto as amostras das lavagens dos filtros (D1 Lav, D2 Lav, E1 Lav e E2 Lav), foram diluídas de 1:1000 por diluições sequenciais de 1:10. As restantes amostras foram diluídas de 1:100, também por diluições sequenciais. As diluições para a análise por cromatografia líquida de alta resolução foram realizadas na FM usada neste método (H₂O ultrapura 18,2 mili-Q/ ACN; 35 %/65 %, v/v). O procedimento executado na análise das amostras pelo método de cromatografia líquida de alta resolução foi o mesmo procedimento executado na otimização do método, apresentado no ponto 1.1 do capítulo II – Materiais e métodos.

2.2.2 – Iodometria

As amostras das Tabelas 2.2 e 2.3 também foram analisadas por iodometria. Neste método as diluições foram feitas com água destilada. De modo a minimizar possíveis erros, foram realizadas diluições sequenciais de 1:10 (9 mL de solvente e 1 mL de amostra). O procedimento executado para a avaliação por iodometria do encapsulamento de H_2O_2 por nanopartículas de sílica ao longo do tempo foi o mesmo procedimento utilizado na otimização do método, apresentado no ponto 1.2 do capítulo II – Materiais e métodos.

3- Caracterização dos têxteis funcionalizados

3.1 – Preparação das amostras

De modo a caracterizar os têxteis funcionalizados foram utilizadas as amostras têxteis sem lavagens e amostras têxteis sujeitas a ciclos de lavagens (5 ciclos para amostras aplicadas por impregnação e 10 ciclos para amostras aplicadas por esgotamento). As amostras foram lavadas segundo o procedimento descrito na norma EN ISO 105-C06. Durante todo o procedimento de lavagem foi utilizada água destilada para evitar interferências com o método de quantificação de H_2O_2 por iodometria. As amostras sem lavagens estão apresentadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Amostras têxteis utilizadas nos métodos de caracterização dos têxteis funcionalizados por esgotamento e impregnação

Amostras	
A	Algodão branqueado com 140 g/cm ² sem tratamentos
B	Algodão tratado com água
C	Algodão tratado com água e auxiliares têxteis
D	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis e H_2O_2
E1%	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis, H_2O_2 e 1 % de nanopartículas de sílica
E2%	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis, H_2O_2 e 2 % de nanopartículas de sílica

Na tabela 2.5 estão apresentadas as amostras sujeitas a ciclos de lavagens (10 ciclos de lavagem para as amostras de esgotamento e 5 para as amostras de impregnação).

Tabela 2.5 - Amostras têxteis sujeitas a ciclos de lavagens utilizadas nos métodos de caracterização dos têxteis funcionalizados por esgotamento com 10 lavagens e por impregnação com 5 lavagens

Amostras	
Esgotamento (10 lavagens)	
B 10L	Algodão tratado com água
C 10L	Algodão tratado com água e auxiliares têxteis
D 10L	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis e H_2O_2
E1% 10L	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis, H_2O_2 e 1 % de nanopartículas de sílica
E2% 10L	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis, H_2O_2 e 2 % de nanopartículas de sílica
Impregnação (5 lavagens)	
B 5L	Algodão tratado com água
C 5L	Algodão tratado com água e auxiliares têxteis
D 5L	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis e H_2O_2
E1% 5L	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis, H_2O_2 e 1 % de nanopartículas de sílica
E2% 5L	Algodão tratado com água, auxiliares têxteis, H_2O_2 e 2 % de nanopartículas de sílica

3.2 – Quantificação de peróxido de hidrogénio no têxtil

Para a quantificação do H_2O_2 nas amostras têxteis, cortaram-se porções de 5 g das amostras fornecidas.

Num matraz devidamente lavado com água destilada, colocaram-se as amostras têxteis previamente pesadas. Adicionaram-se 100 mL de água destilada e 10 mL de ácido sulfúrico 20 % (v/v). Com o auxílio de uma vareta de vidro, agitou-se a mistura e deixou-se repousar durante 10 min. De seguida, adicionaram-se 10 mL de iodeto de potássio 1 % (m/v) e voltou-se a agitar. Deixou-se repousar, novamente,

durante 20 min num matraz devidamente protegido da luz e tapado. Terminado o segundo período de repouso, adicionaram-se 2 gotas da solução catalisadora (utilizada anteriormente na titulação das amostras líquidas). Colocou-se a mistura sob agitação magnética a 400 min^{-1} e adicionou-se o tiosulfato de sódio (0,1 N) com o auxílio de uma seringa, até que a solução adquirisse uma coloração transparente e a amostra têxtil estivesse branca. Determinou-se o volume de tiosulfato de sódio (0,1 N) gasto na titulação e colocou-se as amostras a secar numa estufa a 37°C até que o seu peso estabilizasse. A quantidade de H_2O_2 presente nas amostras têxteis foi determinada pela equação 2.1.

3.3 – Caracterização da superfície das fibras funcionalizadas por MEV

Esta técnica foi usada com o objetivo de caracterizar qualitativamente os tecidos funcionalizados quanto ao aspeto da fibra antes e após as diferentes condições de aplicação descritas na Tabela 2.4, à exceção da amostra A. Foi aplicada uma camada de ouro (50 nm) às amostras, de modo a melhorar a sua visualização. A observação microscópica foi realizada em alto vácuo (60 Pa), com uma voltagem de 5,0 kV. Foi utilizada uma gama de ampliações de 1 000 até 100 000 vezes (1 000, 10 000, 50 000 e 100 000x). Para a deteção das amostras em alto vácuo foram utilizados detetores ETD (*Everhardt Thomley*) e TLD (*Through-lens*). A caracterização das amostras têxteis executadas neste projeto foi realizada pelo microscópio NanoSEM – FEI Nova 200 existente nos Serviços de Caracterização de Materiais na Universidade do Minho (SEMAT).

3.4 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos têxteis funcionalizados (JIS L 1902:2008)

3.4.1 - Método qualitativo – Teste do halo

Para a avaliação qualitativa da atividade antibacteriana dos têxteis funcionalizados, cortaram-se porções das amostras de tecido com as medidas $2,8 \times 2,8 \text{ cm}$. Uma vez que o tecido enrolava, envolveram-se as amostras numa lamela

de vidro e colou-se as extremidades dos tecidos com fita-cola de dupla face na parte superior da lamela, garantindo que a fita-cola não entrava em contacto com o meio de cultura. As amostras analisadas pelo teste do halo encontram-se descritas na Tabela 2.4. Foram analisadas 9 réplicas de cada amostra em três ensaios independentes (3 réplicas por ensaio).

Repicou-se para uma placa de Petri com *tryptic soy agar* (TSA) a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538TM) e incubou-se durante 48 h a 37 °C. Com o auxílio de uma ansa estéril retirou-se uma colónia da cultura preparada anteriormente e inoculou-se em 20 mL de *tryptic soy broth* (TSB). O inóculo foi incubado a 37 °C, 120 min⁻¹, durante 18 a 24 h. Após o período de incubação mediu-se a DO (densidade ótica) do inóculo para determinar a concentração celular. Para tal usou-se a reta de calibração (DO *versus* concentração celular) cedida pela empresa *Success Gadget*, Nanotecnologia e Novos Materiais, Lda, cuja equação da reta é $DO = 4 \times 10^{-10} \text{ UFC} + 0,0799$. Preparou-se uma solução com concentração celular de $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$. Adicionou-se 1 mL da suspensão ($1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$) a cada 14 mL de TSA, ainda em estado líquido. Verteram-se 15 mL de TSA com bactérias para cada placa de Petri. Após a solidificação do meio, colocaram-se as amostras de tecido a testar sobre o TSA e incubou-se a 37 °C durante 18 a 24 h. Após o período de incubação, mediu-se o halo formado em torno da amostra (meio claro sem crescimento bacteriano). Nos casos em que não ocorreu a formação de halo, removeu-se a amostra de modo a verificar se havia ou não crescimento bacteriano debaixo da mesma. A medida do halo foi determinada com base na equação 2.2, em que W , representa a largura do halo formado (mm), T , o comprimento total formado pelo complexo tecido + halo (mm) e D , o comprimento do tecido (mm).

$$W = \frac{T-D}{2} \quad (\text{Equação 2.2})$$

3.4.2 – Método quantitativo – Método de absorção

Para a avaliação quantitativa da atividade antibacteriana dos têxteis funcionalizados, prepararam-se amostras de cada condição descritas nas Tabelas 2.4 e

2.5 com 0,1 g. Foram analisadas 9 réplicas de cada amostra em três ensaios independentes (3 réplicas por ensaio).

Repicou-se para uma placa de Petri com TSA a bactéria *S. aureus* e incubou-se durante 48 h a 37 °C. Com o auxílio de uma ansa estéril retirou-se uma colônia da cultura previamente preparada e inoculou-se 20 mL de TSB. O inóculo foi incubado a 37 °C, 120 min⁻¹, durante 18 a 24 h. Após o período de incubação mediu-se a DO do inóculo com o objetivo de determinar a sua concentração celular. A concentração bacteriana foi ajustada para 3x10⁸ mL⁻¹. Depois de preparado o inóculo, adicionaram-se 0,4 mL do mesmo a 20 mL de TSB num matraz estéril. O novo inóculo foi incubado a 37 °C, 120 min⁻¹, durante 3 ± 1 h. Após o período de incubação, mediu-se novamente a DO do inóculo e determinou-se a concentração celular. Diluiu-se o inóculo com TSB diluído 20 vezes até se obter uma concentração celular final de 3x10⁵ mL⁻¹.

A Figura 2.1 traduz o esquema de diluições sequenciais para a obtenção de uma concentração celular final de 3x10⁵ mL⁻¹. O valor de x indicado na Figura foi calculado através da equação 2.3 tendo em consideração a concentração celular obtida através da reta de calibração (C_i), a concentração celular final estipulada de 3x10⁵ mL⁻¹ (C_f) e o volume final de 5 mL correspondente à diluição 10⁷ mL⁻¹. A partir dessa suspensão fez-se diluições sequenciais de 1:10 tendo em conta o volume final pretendido.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \quad (\text{Equação 2.3})$$

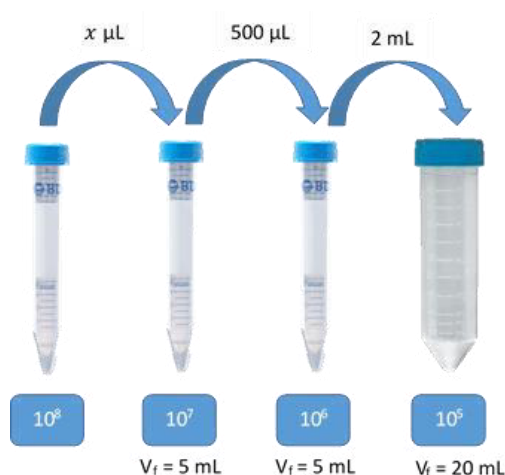


Figura 2.1 - Esquema representativo das diluições sequenciais a realizar de modo a obter uma concentração celular final de 3x10⁵ mL⁻¹.

Após a preparação do inóculo com concentração celular $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ foram adicionados 0,05 mL a cada amostra têxtil, previamente colocadas num falcon estéril. De seguida, incubou-se os tecidos a 37°C , 18 a 24 h. Após o período de incubação, adicionaram-se 5 mL da solução de lavagem (8,5 g de NaCl + 2 g de *tween* + 1 000 mL de H_2O) a cada falcon, vortexando de imediato durante 25 s. Numa placa de 96 poços colocaram-se 180 μL da solução salina NaCl 0,85 % (m/v) da linha B à linha F. Após vortexar os 25 s, transferiu-se 200 μL de cada falcon para cada poço da primeira linha. Iniciou-se então as diluições em série (1:10) transferindo 20 μL da primeira linha para a seguinte e assim sucessivamente até à linha F.

No final das diluições, pipetou-se 10 μL de cada poço (A a F) para uma placa de Petri com TSA, inclinando a mesma para que as gotas deslizassem sobre o meio. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 a 24 h. Para a amostra A (amostra padrão, sem agente antimicrobiano) repetiu-se o procedimento excluindo o ponto referente à incubação das amostras têxteis durante 18 a 24 h (T0h).

O número de células viáveis (M) foi calculado com base na Equação 2.4, em que M representa o número de bactérias viáveis, P a concentração celular obtida pelo método de diluição em série (UFCs x diluição / volume da gota) e C o volume da solução salina NaCl 0,85 % (m/v) + *tween* 0,2 % (m/v) utilizada na lavagem da amostra (mL).

$$M = P \times C \quad (\text{Equação 2.4})$$

A validade do ensaio foi determinada com base no fator de crescimento bacteriano (F), calculado através da equação 2.5, em que M_b é o valor médio do logaritmo do número de bactérias viáveis após 24 h de incubação da amostra padrão (AT24h) e M_a é o valor médio do logaritmo do número de bactérias viáveis no tempo zero (AT0h). Se F for igual ou superior a 1,0 o ensaio é válido, se for inferior a 1,0 o ensaio não é válido.

$$F = M_b - M_a \quad (\text{Equação 2.5})$$

Os valores das atividades bacteriostática e bactericida foram determinados através das equações 2.6 e 2.7, respetivamente, em que S representa o valor da atividade bacteriostática, L o valor da atividade bactericida, M_a o valor médio do número de bactérias viáveis após a inoculação da amostra padrão (AT0h), M_c o valor médio do número de bactérias viáveis após 24 h de incubação das amostras tratadas com agentes antimicrobianos e M_0 representa o valor médio do número de bactérias viáveis após a inoculação das amostras tratadas com agentes antimicrobianos (T0h).

$$S = F - (M_c - M_0) \quad (\text{Equação 2.6})$$

$$L = (M_a - M_c) \quad (\text{Equação 2.7})$$

Capítulo III – Resultados e discussão

1 – Desenvolvimento e otimização de um método de quantificação de peróxido de hidrogénio por cromatografia líquida de alta resolução

A quantificação H_2O_2 em solução é feita regularmente por titulação, como por exemplo iodometria. Apesar do método poder ser executado sem recurso a equipamentos complexos, é moroso e apresenta uma sensibilidade elevada a contaminantes. No presente trabalho pretendeu-se desenvolver e otimizar um método mais rápido e com menor propensão a interferências, mantendo a sensibilidade e reprodutibilidade já conseguidas pela titulação. Assim, a cromatografia líquida de alta resolução é uma possível alternativa ao método iodométrico. Este método apresenta ainda outras vantagens em relação à titulação iodométrica, nomeadamente: (1) volume das amostras requerido ser reduzido, pelo que se torna mais económico em relação à titulação; (2) na titulação, a análise das amostras é realizada manualmente e individualmente, enquanto na cromatografia líquida de alta resolução a análise das amostras é automatizada e sequencial e os resultados são processados por programas informáticos.

1.1 – Quantificação por cromatografia líquida de alta resolução

A quantificação de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução baseou-se na metodologia descrita por Gimeno *et al.* (2015). Foi feita por derivatização, a partir da quantificação da TPPO, produto de reação da oxidação da TPP pelo H_2O_2 .

Na Figura 3.1 estão representados os cromatogramas obtidos para a TPPO utilizando o método desenvolvido de quantificação indireta do H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução. O pico obtido para a TPPO é bem definido e os restantes compostos químicos presentes em solução não interferem com a medição por cromatografia líquida de alta resolução. O tempo de retenção da TPPO obtido foi de 5,65 min. O tempo de retenção equivale ao tempo gasto por cada componente em solução desde que é injetado até ao momento em que é detetado pelo sistema e depende da afinidade do composto para a FM e coluna (Chust, 1990). No caso da

Figura 3.1 (a) existe um primeiro pico entre 1,5 e 2 minutos, que corresponde ao tempo de retenção da fase móvel. O pico obtido aos 5,65 minutos corresponde à TPPO e o terceiro pico (10,5 minutos) corresponde à TPP não consumida na reação.

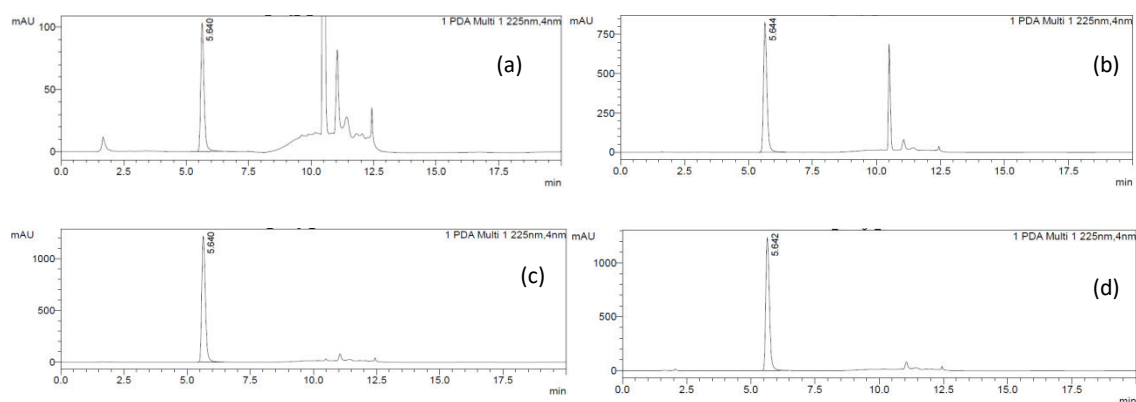


Figura 3.1 – Cromatogramas obtidos na otimização do método de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução. Cromatograma referente à concentração de $17 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a), $165 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b), $330 \mu\text{g mL}^{-1}$ (c) e $660 \mu\text{g mL}^{-1}$ (d) de H_2O_2 .

Com base na Figura 3.1, verificou-se que a partir dos $330 \mu\text{g mL}^{-1}$ o pico de TPP era praticamente nulo, resultado da reduzida quantidade de TPP disponível para reagir com o H_2O_2 presente nas amostras. Desse modo, as áreas obtidas para $330 \mu\text{g mL}^{-1}$ (12 080 590) e $660 \mu\text{g mL}^{-1}$ (12 164 899) de H_2O_2 são semelhantes.

Para determinar o intervalo de concentrações para as quais o H_2O_2 possa ser quantificado de forma precisa, analisou-se um conjunto de soluções com concentrações entre 17 e $660 \mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 utilizando uma solução de TPP 0,01 M.

As retas de calibração relacionam as áreas dos picos obtidos pelo método de cromatografia líquida de alta resolução com as concentrações teóricas das soluções preparadas (método do padrão externo).

A Figura 3.2 (a) apresenta a reta de calibração obtida para concentrações entre 17 e $660 \mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 e a Figura 3.2 (b) apresenta a reta de calibração para valores entre 17 e $165 \mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 .

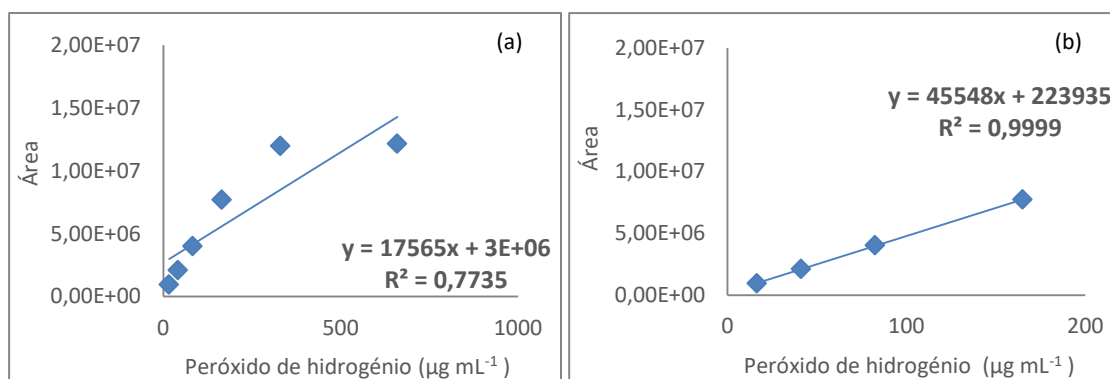


Figura 3.2 – (a) reta de calibração obtida com as soluções padrão com concentrações entre 17 e 660 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 utilizando a solução de TPP 0,01 M. (b) reta de calibração com concentrações entre 17 e 165 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 , utilizando a solução de TPP 0,01 M. Representação das respectivas equações das retas e os fatores de correlação associados.

Tendo em conta que o fator de correlação obtido para os valores entre 17 e 660 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 foi $R^2 = 0,7735$, considerou-se apenas a equação da reta apresentada na Figura 3.2 (b). Assim é possível quantificar H_2O_2 presente nas amostras com concentrações entre 17 – 165 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 , tal como sugerido por Gimeno *et al.* (2015).

Com o objetivo de verificar se o aumento da concentração de TPP melhoraria a linearidade da reta de calibração para concentrações acima de 165 $\mu\text{g mL}^{-1}$, realizou-se um novo ensaio com uma solução de TPP 0,02 M.

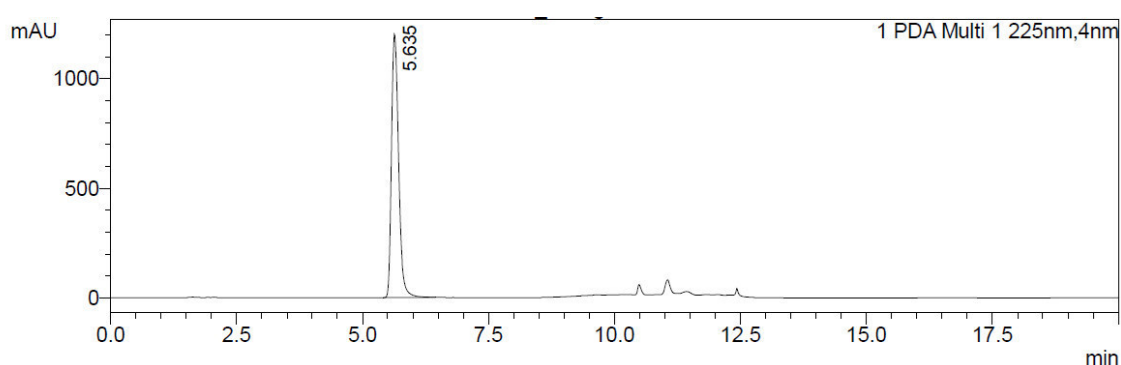


Figura 3.3 – Cromatograma obtido na otimização do método de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução. Cromatograma referente à concentração de 330 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 quantificado com a solução TPP 0,02 M.

Com base na Figura 3.3, verificou-se que a solução TPP 0,02 M não foi suficiente para aumentar a quantidade de TPP residual. Com base na análise feita, o limite de deteção situa-se entre os 17 e os 165 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando 0,01 M TPP para o método desenvolvido de quantificação de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução. A Equação 3.1 foi utilizada na conversão da área dos picos para concentração de H_2O_2 .

$$\text{Área do pico} = 45\,548 \text{ H}_2\text{O}_2 (\mu\text{g mL}^{-1}) + 223\,935 \quad (\text{Equação 3.1})$$

1.2 – Quantificação por iodometria

O método de quantificação de H_2O_2 por iodometria foi proposto pela empresa *Success Gadget*, Nanotecnologia e Novos Materiais, Lda. A iodometria consiste numa titulação por oxidação redução, na qual ocorre a oxidação do iodeto em iodo na presença de um catalisador de molibdato de amónio, sendo o mesmo titulado com tiosulfato de sódio em meio ácido. Esta reação de formação de iodo apresenta uma coloração amarela, intensificada com a adição do catalisador. A titulação termina quando a solução fica incolor por mais de 30 s. Este método foi realizado em paralelo com o método de cromatografia líquida de alta resolução de modo a verificar a seletividade e reprodutividade do mesmo.

Para tal, as soluções testadas por cromatografia líquida de alta resolução foram também quantificadas por iodometria, (4, 41, 83, 330 e 495 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2).

A Tabela 3.1 apresenta a concentração teórica, a percentagem de H_2O_2 (m/m) e a concentração titulada médias e os respetivos desvios padrão.

Tabela 3.1 – Resultados obtidos após a titulação das soluções com concentrações entre 4 e 495 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2

H_2O_2 teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	H_2O_2 titulada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
4	5 ± 1
41	60 ± 19
83	98 ± 2
330	384 ± 3
495	537 ± 19

Tendo por base os valores da Tabela 3.1, é possível determinar a concentração real da solução comercial e converter os valores teóricos utilizados no método de quantificação por cromatografia líquida de alta resolução para valores reais. A solução comercial continha $542\,242\,\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 .

2- Avaliação do encapsulamento do peróxido de hidrogénio por nanopartículas de sílica ao longo do tempo

De modo a estudar a influência das nanopartículas de sílica na quantificação de H_2O_2 por cromatografia líquida de alta resolução, construiu-se o gráfico da Figura 3.4 no qual estão representadas as áreas médias dos picos da TPPO e os respetivos desvios padrão para as amostras sem nanopartículas (D1) e com 1 % (m/v) de nanopartículas (E1).

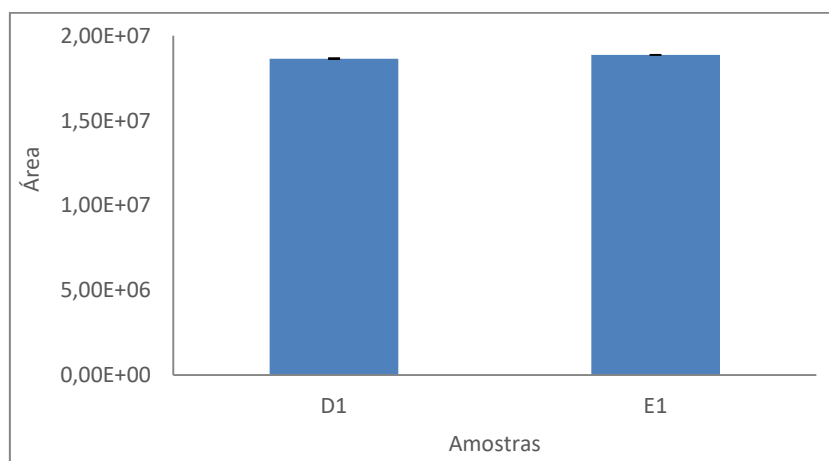


Figura 3.4 – Representação gráfica das áreas dos picos da TPPO obtidos por cromatografia líquida de alta resolução. Amostras: D1 – amostra com $37\,500\,\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 retiradas no tempo T1; E1 - Amostra com $37\,500\,\mu\text{g mL}^{-1}$ de H_2O_2 e 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica retiradas nos tempos T1h. Amostras mantidas em agitação a $400\,\text{min}^{-1}$.

Pela análise do gráfico da Figura 3.4 comprova-se que a presença de nanopartículas de sílica não influenciou a quantificação do princípio ativo por cromatografia líquida de alta resolução, uma vez que as áreas dos picos de TPPO obtidos para as amostras com e sem nanopartículas de sílica são semelhantes e o tempo de retenção manteve-se nos 5,65 min.

A capacidade das nanopartículas de sílica encapsularem o H_2O_2 ao longo do tempo foi avaliada em solução com nanopartículas (amostras E) e sem nanopartículas (amostras D) por cromatografia líquida de alta resolução e por titulação (Figura 3.5).

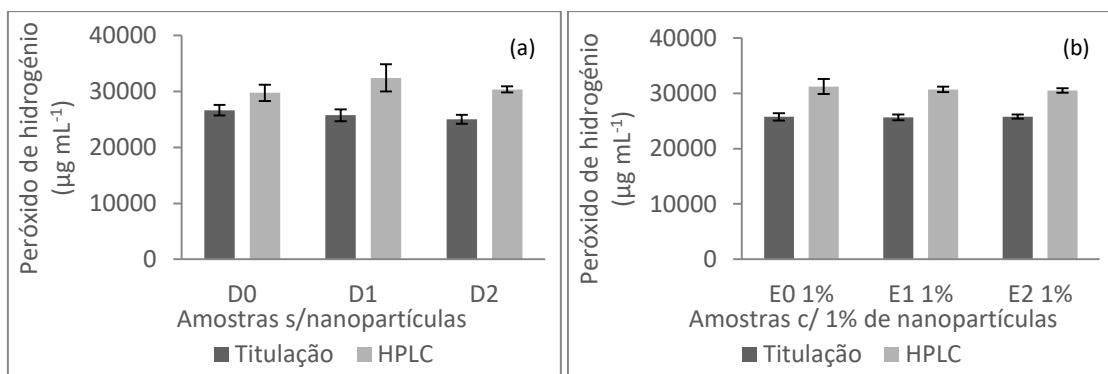


Figura 3.5 - Representação gráfica da concentração de H_2O_2 em solução ao longo do tempo. (a) Amostras sem nanopartículas de sílica no tempo zero horas (D0), após uma (D1) e duas horas (D2). (b) Amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica no tempo zero horas (E0), após uma (E1 1%) e duas horas (E2 1%).

Pela análise da Figura 3.5 verificou-se uma discrepância entre as concentrações de H_2O_2 determinadas pelos dois métodos. Tal como foi mencionado anteriormente, as concentrações obtidas por cromatografia líquida de alta resolução foram mais elevadas comparativamente com as concentrações obtidas por iodometria, uma vez que foram determinadas segundo um padrão externo que considera apenas as concentrações teóricas. Ainda com base na Figura 3.5, verificou-se que não existe variação da concentração de H_2O_2 ao longo do tempo.

De modo a confirmar a retenção de H_2O_2 pelas nanopartículas de sílica, filtrou-se as amostras D1, D2, E1 1% e E2 1% com um filtro PTFE 0,1 μm , para que as nanopartículas ficassem retidas no mesmo e assim fosse possível a quantificação do H_2O_2 na solução filtrada.

Após a filtração das amostras, foi determinada a quantidade de H_2O_2 retida no filtro. Para tal, procedeu-se a 3 lavagens consecutivas dos filtros, utilizados anteriormente, com 5 mL de água destilada.

Na Figura 3.6 estão representados os resultados correspondentes às lavagens dos filtros da D (1) e E (b), obtidos pelos dois métodos.

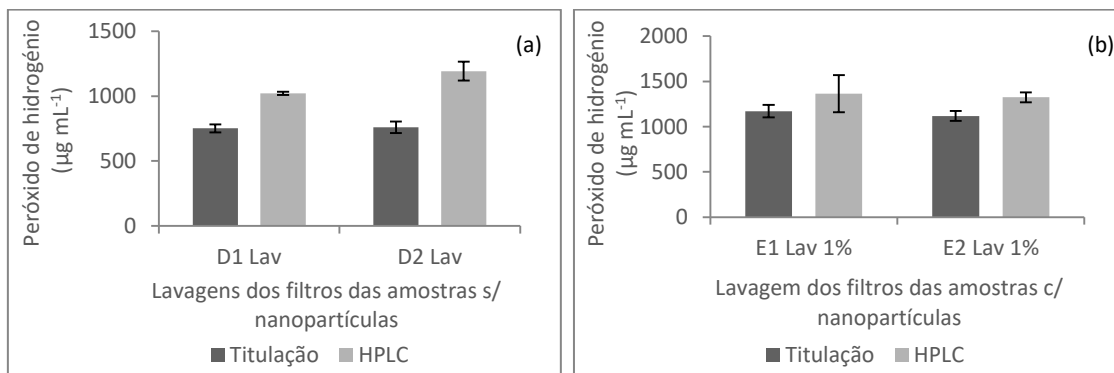


Figura 3.6 – Representação gráfica da concentração de H_2O_2 retido no filtro. (a) Amostras sem nanopartículas de sílica após uma (D1 Lav) e duas horas (D2 Lav) de agitação. (b) Amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica após uma (E1 Lav 1%) e duas horas (E2 Lav 1%) de agitação.

Com este ensaio confirmou-se a retenção de algum H_2O_2 nos filtros. No entanto, verificou-se que a concentração de H_2O_2 obtida nas amostras com nanopartículas de sílica [Figura 3.6 (b)] é superior comparativamente às concentrações obtidas para a amostra D [Figura 3.6 (a)]. Como tal, os valores assinalados no gráfico da Figura 3.6 (a) foram considerados como zeros nas respetivas amostras E1 Lav 1% e E2 Lav 1%. Com os valores apresentados calculou-se o teor de retenção de H_2O_2 nas nanopartículas de sílica.

O teor de retenção de H_2O_2 nas nanopartículas foi calculado com base na equação 3.2, na qual $Et \text{ Lav } 1\%$ corresponde à concentração de H_2O_2 obtida na lavagem dos filtros com nanopartículas, no tempo t (1 h ou 2 h), $Dt \text{ Lav}$ corresponde à lavagem dos filtros das amostras sem nanopartículas (D) no respetivo tempo t . A diferença das concentrações é dividida pela concentração inicial de H_2O_2 obtida para as amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica, no mesmo tempo t .

$$\text{Teor de retenção} = \frac{Et \text{ Lav } 1\% - Dt \text{ Lav}}{Et \text{ } 1\%} \quad (\text{Equação 3.2})$$

A tabela 3.2 apresenta os teores de retenção do H_2O_2 nas nanopartículas de sílica para os dois métodos de quantificação testados.

Tabela 3.2 – Teores de retenção de H_2O_2 nas nanopartículas de sílica para a iodometria e para a cromatografia líquida de alta resolução, para as amostras com 1 % (m/v) de nanopartículas de sílica após uma e duas horas de agitação.

Teor de Retenção	E1 1% (%)	E2 1% (%)
Iodometria	$1,37 \pm 0,13$	$1,16 \pm 0,04$
Cromatografia líquida de alta resolução	$1,12 \pm 0,63$	$0,43 \pm 0,01$

Os resultados apresentados na tabela 3.2 revelaram que houve um eficiente encapsulamento do H_2O_2 pelas nanopartículas de sílica após uma hora de agitação.

3- Caracterização de têxteis funcionalizados

Para testar a influência na adesão à fibra da quantidade de nanopartículas, trataram-se têxteis com 1 % (E1%) e 2 % (E2%) de nanopartículas funcionalizadas com H_2O_2 . Adicionalmente foram analisadas amostras controlo: A – algodão; B – algodão tratado com água; C – algodão tratado com água e auxiliares têxteis e D – algodão tratado com água, auxiliares e H_2O_2 . As amostras foram também sujeitas a ciclos de lavagens de modo a avaliar a resistência da funcionalização das fibras têxteis aos mesmos. A formulação antimicrobiana foi aplicada no têxtil por esgotamento e impregnação, segundo as condições descritas no capítulo II, ponto 3.

3.1 – Quantificação do peróxido de hidrogénio no têxtil

Na Figura 3.7 observa-se a percentagem de H_2O_2 (massa de H_2O_2 /massa do têxtil) em cada amostra têxtil tratada por esgotamento (a) e por impregnação (b). Na Figura 3.7 (a) estão representadas as amostras controlo (A, B, C, D) e as amostras com nanopartículas funcionalizadas (E1% e E2%) tratadas por esgotamento sem lavagens (0L) e sujeitas a 10 ciclos de lavagem (10L). Na Figura 3.7 (b) estão representadas as

amostras controlo (A, B, C, D) e as amostras com nanopartículas funcionalizadas (E1% e E2%) tratadas por impregnação sem lavagens (0L) e sujeitas a 5 ciclos de lavagem (5L). Denote-se que o banho utilizado para funcionalizar as fibras tinha 2 % (m/m) de H_2O_2 para as amostras D e 1,75 % (m/m) para as amostras E (informação fornecida pela empresa e obtida pelo protocolo de iodometria descrito na secção 3 do capítulo II).

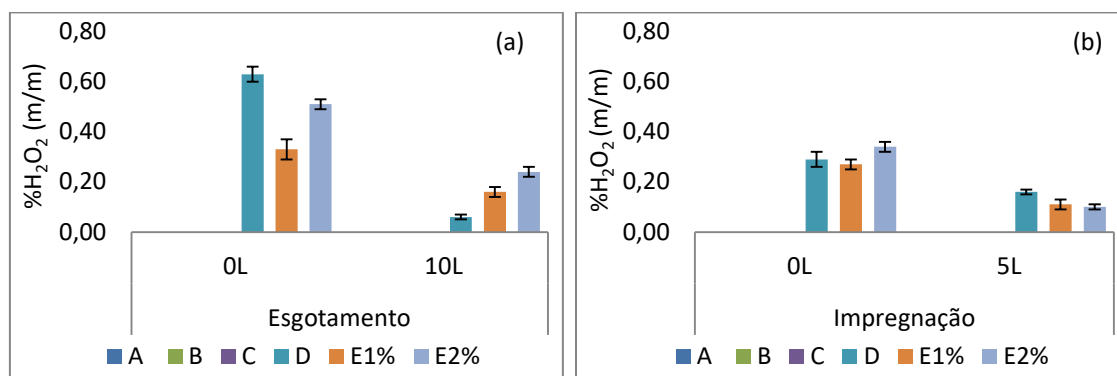


Figura 3.7 – Percentagem de H_2O_2 (m/m) presente nas amostras têxteis, obtida por iodometria. (a) Amostras tratadas por esgotamento sem lavagens (0L) e sujeitas a 10 ciclos de lavagem (10L). (b) Amostras tratadas por impregnação sem lavagens (0L) e sujeitas a 5 ciclos de 5 lavagem (5L).

Relativamente às amostras sem lavagens (0L), os controlos A, B e C não apresentam a coloração amarela aquando da adição de iodeto de potássio, para ambos os processos de aplicação (esgotamento e impregnação). Concluiu-se, portanto, que o algodão e os auxiliares têxteis não interferem na titulação iodométrica nem contêm H_2O_2 . Nas restantes amostras (D, E1% e E2%) verificou-se a coloração amarela aquando da adição do iodeto de potássio, comprovando a presença de H_2O_2 nas mesmas.

Relativamente às lavagens, as amostras B e C preparadas por esgotamento e com 10 ciclos de lavagem adquiriram uma coloração amarela, equivalente a 0,04 % (m/m) de H_2O_2 . Sabendo que não foi adicionado princípio ativo a estas amostras, a coloração amarela poderá dever-se à presença de um elemento químico, por exemplo o hipoclorito de sódio, presente na água e que interfere na titulação (Arce *et al.*, 2013). Tendo em conta a Equação 2.1, o valor referido foi utilizado como branco no tratamento dos resultados relativos às 10 lavagens no esgotamento. Nas amostras preparadas por impregnação não se verificou esta contaminação.

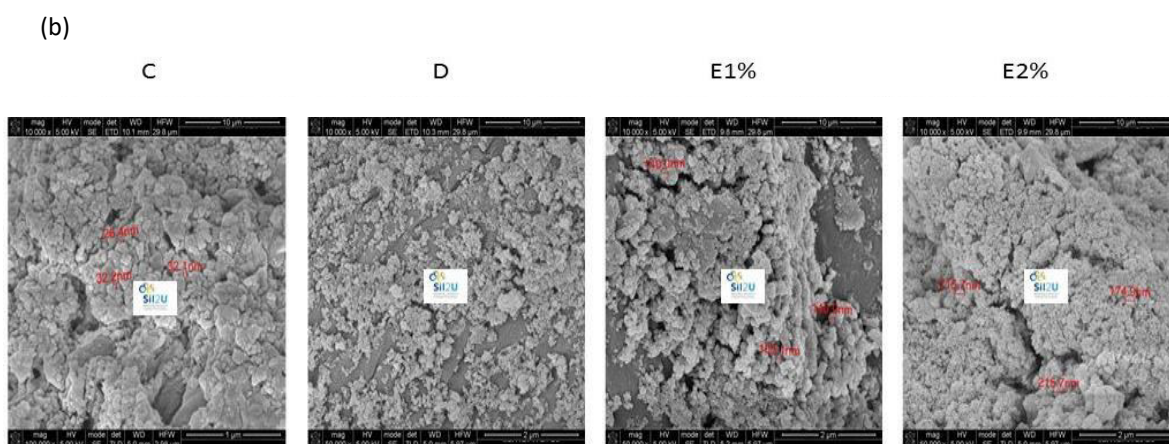
No que diz respeito às amostras funcionalizadas por esgotamento [Figura 3.7 (a)], o uso de nanopartículas de sílica no processo é vantajoso, pois a perda de H_2O_2 após as lavagens foi menor para as amostras com nanopartículas (E1% e E2%) comparativamente às amostras sem nanopartículas (D). Verificou-se ainda que apesar de E1% OL apresentar inicialmente menos H_2O_2 (0,33 % m/m) que E2% OL (0,54 % m/m), após os 10 ciclos de lavagem, ambas as amostras conservaram cerca de metade do H_2O_2 inicial (E1% 10L 0,16 % m/m; E2% 10L 0,24 % m/m).

Os valores de H_2O_2 nas amostras obtidas por impregnação [Figura 3.7 (b)] apresentaram um comportamento ligeiramente diferente das amostras de esgotamento. Neste caso, as amostras sem lavagens (D, E1% e E2% OL) apresentam valores de H_2O_2 semelhantes. No entanto, após os 5 ciclos de lavagem, a amostra D reteve mais princípio ativo que as amostras funcionalizadas com nanopartículas (E1% e E2% 5 L).

Comparando os métodos de aplicação, observou-se que as amostras com nanopartículas de sílica obtidas por esgotamento apresentam uma percentagem de H_2O_2 superior às amostras obtidas por impregnação, mesmo após 10 ciclos de lavagem. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de no esgotamento os tecidos ficarem em contacto com o banho durante 90 minutos a 40 °C. E no processo de impregnação os tecidos serem pressionados entre cilindros após entrarem em contacto com o banho, de modo a que a fixação dos componentes do banho seja bem-sucedida. O tempo de contacto entre o tecido e o banho é menor no caso da impregnação, logo o tempo de reação entre as nanopartículas funcionalizadas e o têxtil também é menor, justificando assim a diferença de concentrações obtidas nos dois processamentos têxteis.

3.2 – Caracterização da superfície das fibras funcionalizadas por microscopia eletrónica de varrimento (MEV)

O estudo das amostras por MEV teve como objetivo analisar o aspeto da superfície das fibras têxteis após a deposição das nanopartículas de sílica funcionalizadas com H_2O_2 .



51

A Figura 3.9 apresenta os resultados obtidos por MEV das amostras têxteis funcionalizadas com nanopartículas de sílica aplicadas por impregnação.

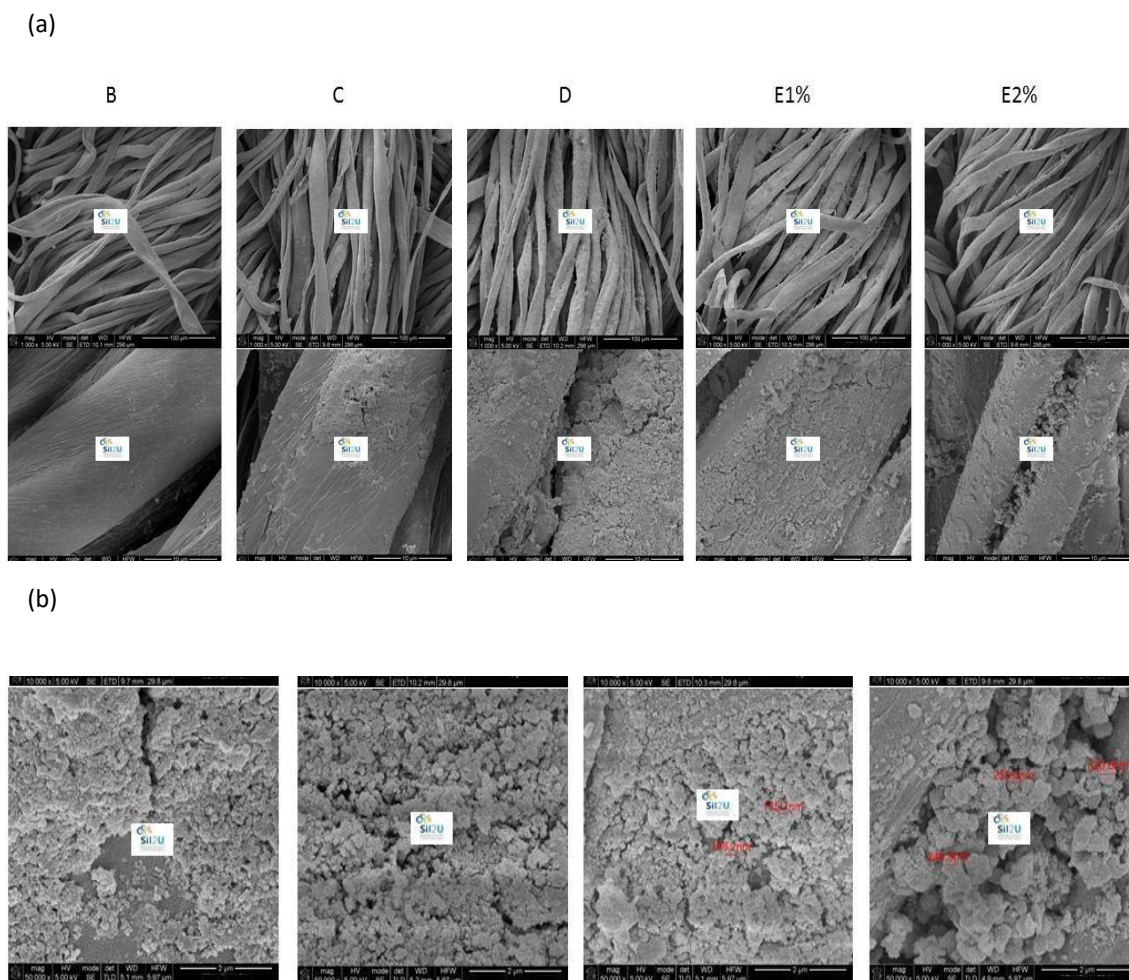


Figura 3.9 – (a) Resultados obtidos por *MEV* para amostras aplicadas por impregnação: B (algodão), C (Algodão tratado com auxiliares), D (algodão com auxiliares e H_2O_2), E1% (algodão com auxiliares e funcionalizado com 1 % de nanopartículas de sílica e H_2O_2) e E2% (algodão com auxiliares e funcionalizado com 2 % de nanopartículas de sílica e H_2O_2). Ampliações utilizadas: B – 1 000x e 10 000x; C, D, E1% e E2% – 1 000x, 10 000x e 50 000x. (b) Adaptação da Figura 3.8 para as amostras C, D, E1% e E2%.

Relativamente às amostras aplicadas por esgotamento (Figura 3.8), as amostras C, D, E1% e E2% apresentam uma superfície mais rugosa em relação ao algodão em cru (amostra B), consequência da deposição de sais e das nanopartículas de sílica (para as amostras E1% e E2%). A amostra C apresenta um aglomerado de sais que cobre a

superfície fibrosa quase na sua totalidade. Na amostra D, que contém auxiliares e H_2O_2 , verificou-se uma redução da agregação dos sais e uma distribuição mais homogênea dos mesmos sobre as fibras. Relativamente às amostras funcionalizadas com nanopartículas (E1% e E2%), observou-se que a percentagem de nanopartículas depositadas nas fibras está diretamente relacionada com a percentagem de nanopartículas na formulação inicial, isto é, as amostras tratadas com 2 % de nanopartículas de sílica apresentam uma área coberta por nanopartículas superior à amostra E1%.

No que diz respeito às amostras C, D E1% e E2% aplicadas por impregnação (Figura 3.9), estas apresentaram uma superfície menos coberta por sais e/ou nanopartículas quando comparadas com as amostras de esgotamento. Esse facto é mais evidente nas amostras C e E2%. Como já foi referido anteriormente, confirma-se que o processo de fixação das nanopartículas funcionalizadas com H_2O_2 por impregnação não é tão eficaz como o esgotamento, para as condições utilizadas.

3.3 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos têxteis funcionalizados (JIS L 1902:2008)

A análise da atividade antimicrobiana dos têxteis funcionalizados com H_2O_2 encapsulado por nanopartículas de sílica foi realizada tendo por base o teste do halo (qualitativo) e o método de absorção (quantitativo) descritos na norma JIS L 1902:2008 (Japanese Industrial Standard, 2008).

3.3.1 – Método qualitativo – Teste do halo

Testaram-se as amostras: A - algodão, B - algodão tratado com água, C - algodão tratado com água e auxiliares têxteis, D - algodão tratado com auxiliares têxteis e H_2O_2 , E1% - algodão tratado com auxiliares têxteis, H_2O_2 e 1 % de nanopartículas de sílica e E2% - algodão tratado com auxiliares têxteis H_2O_2 e 2 % de nanopartículas de sílica, utilizando o teste do halo para fazer uma primeira avaliação das amostras têxteis.

A formação do halo resulta da capacidade de difusão dos agentes antimicrobianos. Os compostos difusos são capazes de migrar das fibras têxteis para o meio sólido, interagindo com os microrganismos e atuar sobre eles no próprio tecido e no espaço envolvente. Dessa ação resulta a formação de um halo (zona sem crescimento microbiano). Os compostos não difusos não migram e por isso não potencializam a formação de um halo, contudo impedem o crescimento microbiano nas zonas onde está presente (CITEVE, 2008).

A Figura 3.10 apresenta os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis tratadas por esgotamento.

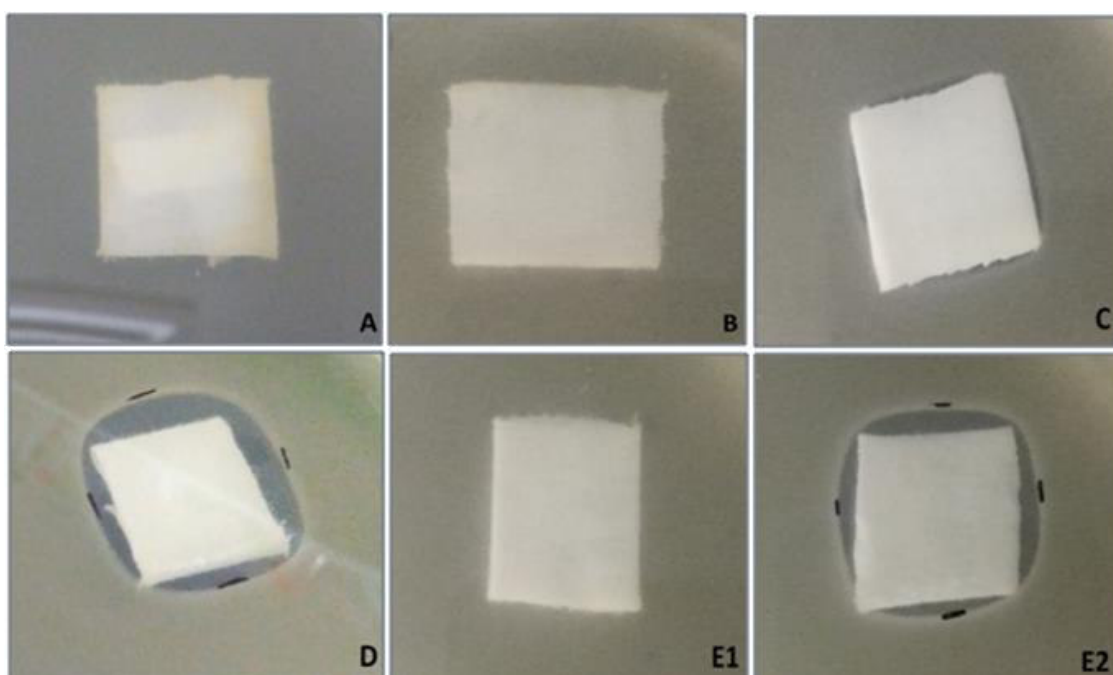


Figura 3.10 – Resultados obtidos no teste qualitativo das amostras funcionalizadas por esgotamento. A (algodão), B (algodão tratado com água), C (Algodão tratado com auxiliares), D (algodão com auxiliares e H_2O_2), E1 (algodão com auxiliares e funcionalizado com 1 % de nanopartículas de sílica e H_2O_2) e E2 (algodão com auxiliares e funcionalizado com 2 % de nanopartículas de sílica e H_2O_2).

A Figura 3.11 apresenta os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana das amostras têxteis tratadas por impregnação.

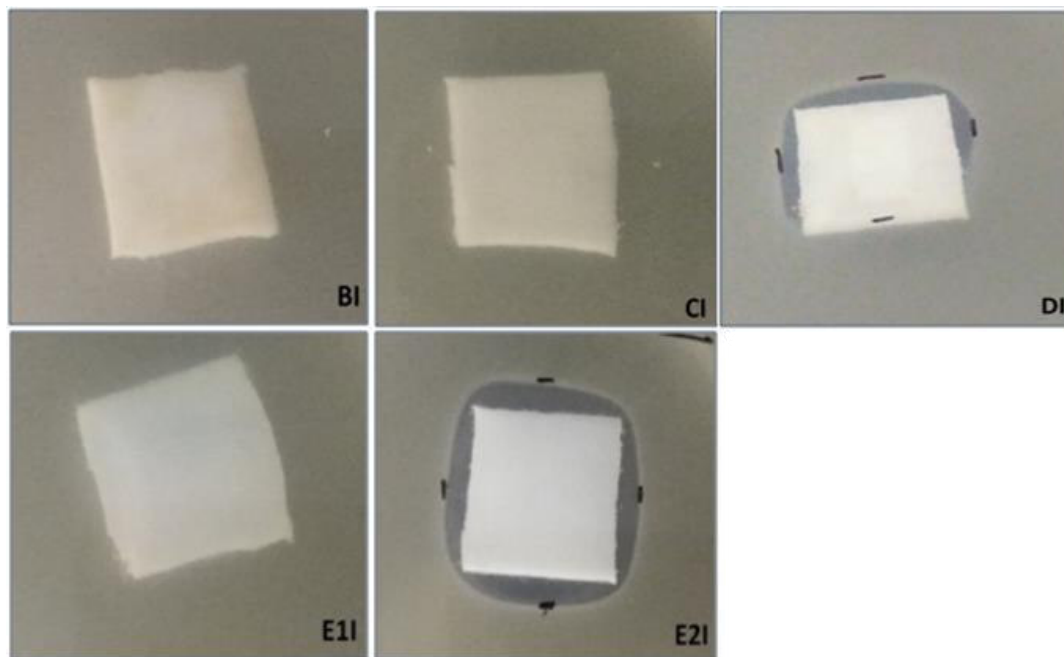


Figura 3.11 – Resultados obtidos no teste qualitativo das amostras funcionalizadas por impregnação. BI (algodão tratado com água), CI (Algodão tratado com auxiliares), DI (algodão com auxiliares e H_2O_2), E1I (algodão com auxiliares e funcionalizado com 1 % de nanopartículas de sílica e H_2O_2) e E2I (algodão com auxiliares e funcionalizado com 2 % de nanopartículas de sílica e H_2O_2).

Analisando as Figuras 3.10 e 3.11, observa-se que as amostras D e E2 % apresentam formação de halo e a amostra E1% não. A ausência de halo nesta amostra pode estar associada à menor percentagem de H_2O_2 verificada na quantificação de H_2O_2 no têxtil (ponto 3.1). A percentagem de H_2O_2 quantificado no têxtil por iodometria foi superior para as amostras D e E2%, comparativamente à amostra E1%, tanto no esgotamento como na impregnação.

A Tabela 3.3 traduz os valores calculados com base na Equação 2.2 obtidos para as amostras testadas.

Tabela 3.3 – Resultados médios obtidos no teste qualitativo para as amostras testadas pelo teste do halo. A (algodão cru), B (algodão tratado com água), C (Algodão tratado com auxiliares), D (algodão com auxiliares e H₂O₂), E1 (algodão com auxiliares e funcionalizado com 1 % de nanopartículas de sílica e H₂O₂) e E2 (algodão com auxiliares e funcionalizado com 2 % de nanopartículas de sílica e H₂O₂). T representa a largura do complexo amostra + halo em mm, D representa o comprimento da amostra em mm e W representa a largura do halo formado

Amostra		T (mm)	D (mm)	W (mm)
Esgotamento	A	Sem halo Crescimento bacteriano por baixo do tecido		
	B	Sem halo Crescimento bacteriano por baixo do tecido		
	C	Com halo Sem crescimento bacteriano por baixo do tecido		
	D	26,0	20,5	2,8
	E1%	Sem halo Sem crescimento bacteriano por baixo do tecido		
	E2%	27,3	21,0	3,2
	Impregnação	B	Sem halo Crescimento bacteriano por baixo do tecido	
C		Sem halo Sem crescimento bacteriano por baixo do tecido		
D		25,0	21,0	2,0
E1%		Sem halo Sem crescimento bacteriano por baixo do tecido		
E2%		28,0	21,3	3,3

Tal como esperado, as amostras controlo A e B não apresentaram halo, mas verificou-se crescimento por baixo do tecido. No entanto, as amostras C não apresentaram crescimento bacteriano por baixo do tecido, sugerindo que os auxiliares possuem alguma atividade antimicrobiana. As amostras funcionalizadas com o princípio ativo (D) e com 2 % de nanopartículas com H₂O₂ (E2%) apresentaram

formação de halo resultado da capacidade de difusão do princípio ativo e consequente inibição do crescimento bacteriano. No entanto, para quantificar a atividade antimicrobiana registada no teste qualitativo, procedeu-se à avaliação das mesmas amostras pelo método de absorção.

3.3.2 – Método quantitativo – Método de absorção

Para determinar a validade do teste realizado segundo a norma JIS L 1902:2008 (Japanese Industrial Standard, 2008), após 18 a 24 h de incubação deve ocorrer crescimento bacteriano, ou seja, a amostra A deverá apresentar um número de UFCs superior ao número no tempo zero ($F = 3,19 \pm 0,77$, Equação 2.5). Para as amostras sem lavagens verificou-se um crescimento celular de $3,19 \pm 0,33 \text{ mL}^{-1}$ após 24 h e para as amostras sujeitas a ciclos de lavagens verificou-se um crescimento de $3,62 \pm 0,03 \text{ mL}^{-1}$. Verifica-se que os valores de F ($F = 3,19$) estão em conformidade com o pressuposto da norma pelo que se considerou o ensaio válido.

A Figura 3.12 traduz o gráfico do logaritmo do número de UFCs por mL registadas para cada amostra tratada por esgotamento com e sem lavagens.

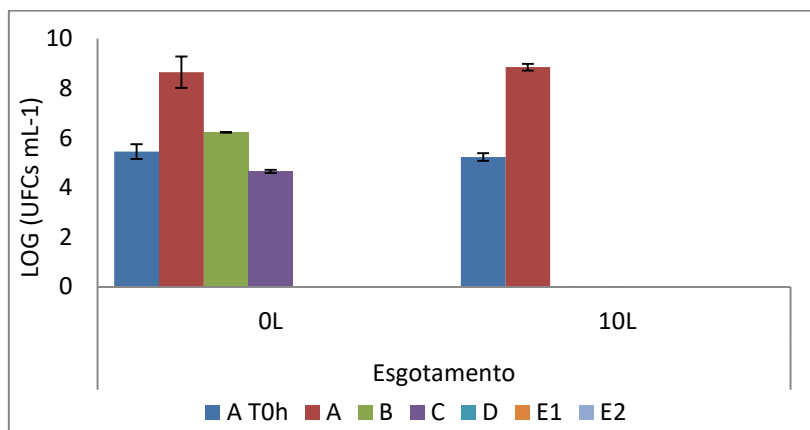


Figura 3.12 - Média do logaritmo do número de UFCs por mL em cada amostra testada nos três ensaios independentes realizados com as amostras tratadas por esgotamento com 0 (0L) e 10 lavagens (10L). Amostras testadas: A T0h e A - Amostras sem tratamento; B – Amostras tratadas com água; C – Amostras tratadas com auxiliares têxteis; D – Amostras tratadas com auxiliares têxteis e H_2O_2 ; E1 e E2 – Amostras tratadas com auxiliares têxteis e H_2O_2 e 1 e 2 % (m/v) de nanopartículas de sílica, respetivamente.

A Figura 3.13 traduz o gráfico do logaritmo do número de UFCs por mL registradas para cada amostra tratada por impregnação com e sem lavagens.

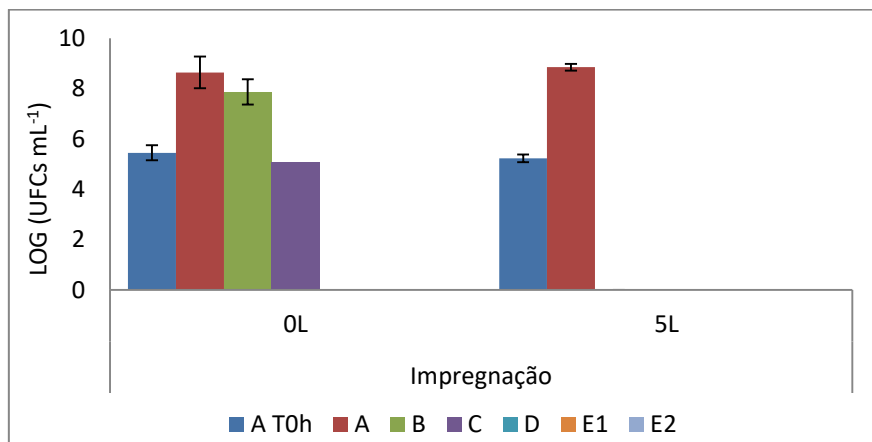


Figura 3.13 – Média do logaritmo do número de UFCs por mL em cada amostra testada nos três ensaios independentes realizados com as amostras tratadas por impregnação com 0 (OL) e 5 lavagens (5L). Amostras testadas: A T0h e A – Amostras sem tratamento; B – Amostras tratadas com água; C – Amostras tratadas com auxiliares têxteis; D – Amostras tratadas com auxiliares têxteis e H₂O₂; E1 e E2 – Amostras tratadas com auxiliares têxteis e H₂O₂ e 1 e 2 % (m/v) de nanopartículas de sílica, respectivamente.

Pela análise da Figura 3.12 referente às amostras processadas por esgotamento, constatou-se que nas amostras sem lavagens ocorreu crescimento bacteriano nas amostras A e B, resultado esperado, pois não possuem agentes antimicrobianos. Na amostra C houve uma ligeira inibição do crescimento (atividade bactericida), sendo o número de UFCs recuperado semelhante ao valor obtido na amostra A T0h. Como verificado no teste qualitativo, os auxiliares têxteis apresentaram alguma atividade antimicrobiana, embora menor do que as amostras com H₂O₂. Nas amostras com o princípio ativo não se verificou crescimento bacteriano. Observou-se o mesmo nas amostras sem lavagens processadas por impregnação (Figura 3.13).

Para determinar o efeito bactericida (L) (morte bacteriana) e o efeito bacteriostático (S) (inibição do crescimento bacteriano) das amostras com base nas Equações 2.6 e 2.7 seria necessário que houvesse um crescimento bacteriano, ainda que reduzido (Japanese Industrial Standard, 2008). Visto que não ocorreu crescimento

bacteriano nas amostras D, E1% e E2%, quer funcionalizadas por esgotamento quer por impregnação, pode referir-se que as mesmas apresentaram atividade bactericida.

As amostras têxteis foram sujeitas a ciclos de lavagem para avaliar a resistência da funcionalização. Com base nos resultados obtidos, as amostras D, E1% e E2% conseguiram inibir o crescimento bacteriano na totalidade, para ambos os métodos de funcionalização. Para ser possível determinar se as nanopartículas melhoram a resistência do princípio ativo ao desgaste causado pelas lavagens, seria necessário submeter as amostras têxteis a mais ciclos de lavagem.

A amostra B e C após 5 ou 10 ciclos de lavagem apresentaram atividade antimicrobiana. No caso do esgotamento, foi quantificado H_2O_2 ou outro contaminante na titulação, justificando a ação bactericida das mesmas. Apesar de não ter sido detetado H_2O_2 nas amostras B e C aplicadas por impregnação estas apresentaram atividade antimicrobiana. Esta pode dever-se à transferência do princípio ativo ao colocar as amostras controlo em contacto com as amostras D e E ou por problemas durante a execução do método.

Comparando os resultados biológicos com os resultados obtidos na quantificação de H_2O_2 nos têxteis funcionalizados, verificou-se que os resultados estão em conformidade. Apesar de após os 5 e 10 ciclos de lavagem a quantidade de H_2O_2 no têxtil ser menor, essa quantidade revelou-se suficiente para inibir o crescimento microbiano.

Conclusões

O presente trabalho consistiu no estudo do encapsulamento de H_2O_2 por nanopartículas de sílica e na avaliação da sua atividade antimicrobiana quando aplicadas em têxteis (têxteis funcionalizados por impregnação e esgotamento).

Comparando os dois métodos testados para a quantificação de H_2O_2 , cromatografia líquida de alta resolução otimizado e iodometria verificou-se que em ambos se obtiveram resultados semelhantes.

Através dos resultados obtidos no ensaio de encapsulamento do H_2O_2 em nanopartículas de sílica, concluiu-se que a presença das nanopartículas não influencia a quantificação do H_2O_2 . Foi também confirmado o encapsulamento de H_2O_2 pelas nanopartículas de sílica.

As nanopartículas de sílica permitiram uma maior resistência às lavagens, uma vez que a perda de H_2O_2 após ciclos de lavagem é menos evidente do que nas amostras sem nanopartículas.

Através do método de quantitativo de avaliação da atividade antimicrobiana concluiu-se que ciclos de 5 e 10 lavagem (utilizados em impregnação e esgotamento, respetivamente) não foram suficientes para avaliar a resistência dos têxteis funcionalizados às lavagens, uma vez que as amostras com e sem nanopartículas apresentaram total inibição do crescimento bacteriano.

Em geral, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o encapsulamento do H_2O_2 por nanopartículas de sílica é um processo vantajoso, uma vez que, para além de manterem a atividade antimicrobiana do princípio ativo, confere resistência às lavagens aos têxteis funcionalizados.

Perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido nesta tese de mestrado permitiu perceber a necessidade de desenvolver novos métodos de quantificação de peróxido de hidrogénio mais rápidos e mais económicos, nomeadamente a cromatografia líquida de alta resolução. Comparativamente à quantificação por iodometria, a cromatografia líquida de alta resolução enquadrou-se nos requisitos propostos, contudo revelou-se apenas aplicável a amostras líquidas. Como tal, é fundamental implementar novos métodos ou otimizar o método utilizado neste trabalho, de modo a que este seja aplicável às amostras têxteis funcionalizadas com peróxido de hidrogénio.

Como foi possível verificar no presente trabalho, os ciclos de lavagem testados não foram suficientes para a avaliação da resistência do peróxido de hidrogénio a lavagens. É portanto, aconselhável em projetos futuros o teste de um maior número de ciclos de lavagem, tanto no processo de esgotamento como na impregnação, para que seja possível a comparação destes dois processamentos têxteis.

Os testes foram realizados apenas em algodão cru. Seria também interessante do ponto de vista tecnológico testar os pressupostos iniciais deste projeto em outros tipos de substratos têxteis. Seria também interessante testar noutras bactérias, como por exemplo a *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, que também são propostas pela norma JIS L 1902:2008.

Bibliografia

(Abreu, 2004) Abreu, Â. A. V. (2004). Identificação de bactérias filamentosas em processos de lamas activadas através da técnica de hibridização in-situ de fluorescência (FISH). Universidade do Minho.

(AJSC Monteiro, 1982) AJSC Monteiro. (1982). Capítulo 4 – Técnicas de caracterização de revestimentos. *Técnicas de Caracterização de Revestimentos*, 26–56.

(Arce et al., 2013) Arce, A. Q., & Xavier, A. T. de S. (2013). Determinação de cloro ativo em produto comercial: cloro para piscina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

(Blyskal, 2009) Blyskal, B. (2009). Fungi utilizing keratinous substrates. *Int Biodeterior Biodegrad*.

(Broadbent, 2001) Broadbent, D. A. (2001). Basic principles of textile coloration. Society of Dyers and Colourists.

(Cabral et al., 2003) Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., & Gama, M. (2003). Engenharia enzimática.

(CEE, 1982) CEE. (1982). SEGUNDA DIRETIVA DA COMISSÃO de 14 de Maio de 1982 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos métodos de análise necessário ao controlo da composição dos produtos cosméticos. 82/434/CEE. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, 179–205.

(Chust, 1990) Chust, R. B. (1990). Introdução cromatografia de líquidos (HPLC). *Cromatografia De Líquidos, BOLETIM SP*, 43–54. Retrieved from <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/563/article/3000458/pdf>

(CITEVE, 2008) CITEVE. (2008). *saberfuncionais*.

(CITEVE, 2012) CITEVE. (2012). Guia de boas práticas para a eficiência energética no setor têxtil e do vestuário. *Famalicão*.

(Constantino et al., 2004) Constantino, M. G., Silva, G. V. J. Da, & Donate, P. M. (2004). *Fundamentos de química experimental Vol. 53*. (EdUSP, Ed.).

(Costa, 2014) Costa, A. L. B. (2014). Avaliação de amaciadores para uso na indústria têxtil.

(DB algodão, 2016) DB algodão. (2016). DB algodão. Retrieved June 20, 2016, from <http://www.db.agr.br/views/algodao.php>

(ECHA, 2016) ECHA. (2016). Por que são importantes as substâncias químicas? Retrieved April 14, 2016, from <https://echa.europa.eu/chemicals-in-our-life/why-are-chemicals-important>

(Esteves, 2009) Esteves, D. F. (2009). Aperfeiçoamento das técnicas de avaliação da actividade antimicrobiana em materiais têxteis.

(Evonik industries, 2016) Evonik industries. (2016). Sobre peróxido de hidrogénio. Retrieved from <http://h2o2.evonik.com/product/h2o2/pt/about/general/pages/default.aspx>

(Ferreira *et al.*, 2010) Ferreira, W. F. C., Sousa, J. C. F. de, & Lima, N. (2010). Microbiologia. Microbiologia. LIDEL.

(Freixo, 2013) Freixo, L. (2013). Micro e nanoencapsulação como estratégias de estabilização de entidades bioativas: proteínas, enzimas e bacteriófagos. Universidade Fernando Pessoa. Retrieved from <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3975/1/Monografia.pdf>

(Gimeno *et al.*, 2015) Gimeno, P., Bousquet, C., Lassu, N., Maggio, A. F., Civade, C., Brenier, C., & Lempereur, L. (2015). High-performance liquid chromatography method for the determination of hydrogen peroxide present or released in teeth bleaching kits and hair cosmetic products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107(790), 386–393. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.018>

(Gomes, 2013) Gomes, P. M. da C. (2013). Aplicação de nano partículas de sílica coloridas na estampanaria. Universidade do Minho.

(Ingamells, 1993) Ingamells, W. (1993). Colour for textiles. Society of Dyers and Colourists.

(Cepeda *et al.*, 2005) J. A. Cepeda, Whitehouse, T., Cooper, B., Hails, J., Jones, K., Kwaku, F., Shaw, S. (2005). Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two center study. *The Lancet*, 295–304.

(Japanese Industrial Standard, 2008) Japanese Industrial Standard. (2008). Testing of antibacterial activity and efficacy on textile products. JIS L 1902:2008 (JTETC/JSA)

(Kim *et al.*, 2001) Kim, Y. H., & Sun, G. (2001). Durable antimicrobial finishing of nylon fabrics with acid dyes and a quaternary ammonium salt. *Textile Research Journal*, 71(4), 318–323.

(Kniehl *et al.*, 2005) Kniehl, E., Becker, A., & Forster, D. H. (2005). Bed, bath and beyond: pitfalls in prompt eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrier status in healthcare workers. *Journal of Hospital Infection*, 180–187.

(Kumar, 2014) Kumar, R. S. (2014). Antimicrobial finishes. *Textiles for Industrial Applications*.

(Machado et al., 2008) Machado, M., Morgado, J., & Silva, R. (2008). Manual técnico do formador - Acabamento de substratos têxteis (CITEVE). Famalicão.

(Magalhães, 2015) Magalhães, A. P. S. A. de. (2015). Atividade antimicrobiana em têxteis. Universidade do Porto.

(Maria et al., 2008) Maria, R., Morgado, J., & Silva, A. (2008). *Manual técnico do formador - Tecnologia de enobrecimento* (CITEVE). Famalicão.

(Marques, 2015) Marques, M. R. S. (2015). Acabamentos químicos em tecidos. Universidade do Minho.

(Medeiros, 2016) Medeiros, M. K. De. (2016). Tecnologia têxtil. Universidade Anhembi Morumbi, 1–22.

(NEBM, 2016) NEBM, I. (2016). Agentes antimicrobianos químicos. Retrieved April 15, 2016, from <https://nebm.ist.utl.pt/repositorio/download/1764/2>

(Neto, 2016) Neto, P. M. (2016). AC - Apostila - Aula3. Retrieved October 11, 2016, from <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA-CMAI/ac-apostila-aula3>

(O'Brien et al., 2002) O'Brien, J. P., & Aneja, A. P. (2002). Fibre for the next millenium. Review of Progress in Coloration.

(Oliveira, 1997) Oliveira, M. H. (1997). Principais matérias-primas utilizadas na indústria têxtil. BNDES Setorial, (5), 1–40. Retrieved from http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/mprev.pdf

(Pinho et al., 2011) Pinho, E., Magalhães, L., Henriques, M., & Oliveira, R. (2011). Antimicrobial activity assessment of textiles: Standard methods comparison. *Annals of Microbiology*, 61(3), 493–498.

(Pinto et al., 2010) Pinto, A., Pinto, T., & Kaneko, T. (2010). Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos: controle de produtos estéreis ênfase nos processos assépticos tecnologia de isoladores. (3rd ed.). São Paulo: Atheneu.

(Ristić et al., 2011) Ristić, T., Zemljič, L. F., Novak, M., Kunčič, M. K., Sonjak, S., Cimerman, N. G., & Strnad, S. (2011). Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 36–51.

(Sá, 2008) Sá, M. M. A. M. de. (2008). Aplicação de β -ciclodextrinas no tingimento de materiais têxteis.

(Sánchez et al., 1981) Sánchez, J. C., Valldeperase, J., & Puente, P. (1981). *Fundamentos científicos y aplicados de la tintura de materiais textiles*. Terrassa, Cátedra de tintoreria y estampación de E.T.S.I.I.T.

(Schindler et al., 2004) Schindler, W. D., & Hauser, P. J. (2004). *Chemical finishing of textiles*. *Chemical Finishing of Textiles*. <http://doi.org/10.1533/9781845690373.121>

(SEMAT, 2016) SEMAT. (2016). SEMAT. Retrieved September 12, 2016, from http://www.semat.lab.uminho.pt/Equipamento_1.htm

(Shahidi et al., 2012) Shahidi, S., & Wiener, J. (2012). Antibacterial agents in textile industry. *Antimicrobial Agents*. Bobbarala :InTech.

(Soutinho, 2006) Soutinho, H. F. D. C. (2006). Design funcional de vestuário interior, 237.

(Stefanović et al., 2012) Stefanović, O., Radojević, I., Vasić, S., & Čomić, L. (2012). Antibacterial activity of naturally occurring compounds from selected plants. University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.

(Success Gadget, 2016) Success Gadget. (2016). Os têxteis do futuro. Retrieved January 16, 2016, from <http://www.success-gadget.com/pt/os-texteis-do-futuro>

(Szostak-Kotowa, 2004) Szostak-Kotowa, J. (2004). Biodeterioration of textiles. *Int Biodeterior Biodegrad*.

(Tarvina et al., 2010) Tarvina, M., McCordb, B., Mountc, K., Sherlachd, K., & Miller, M. L. (2010). Optimization of two methods for the analysis of hydrogen peroxide: High performance liquid chromatography with fluorescence detection and high performance liquid chromatography with electrochemical detection in direct current mode. *Journal of Chromatography A*, 1217(48), 7564–7572.

(Trophicolor, 2008) Troficolor, T. S. A. (2008). Processamentos têxteis. Trofa, Portugal.

(Trophicolor, 2016a) Troficolor. (2016a). 02 . Fibras têxteis. Processos Têxteis. Trofa, Portugal

(Trophicolor, 2016b) Troficolor. (2016b). 04 . Finishing. Textile Processes, 22–37. Trofa, Portugal

(Van Sorge et al., 2013) Van Sorge, N. M., Beasley, F. C., Gusarov, I., Gonzalez, D. J., Von K?ckritz-Blickwede, M., Anik, S., Nizet, V. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial nitric-oxide synthase affects antibiotic sensitivity and skin abscess development. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6417–6426. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.448738>

(Ventura et al., 2011) Ventura, S., Carneiro, N., & Souto, A. P. (2011). Acabamento de têxteis multifuncionais com nanocompósitos poliméricos. Nova Têxtil. Universidade do Minho. Retrieved from <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/15664>

(Vieira, 2006) Vieira, R. (2006). Estudo da eficiência e durabilidade de diversos métodos de fixação de produtos antimicrobianos em fibras celulósicas. Universidade do Minho. Retrieved from [http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6713/1/Tese de mestrado Raquel Vieira Outubro 2006 Corrigida.pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6713/1/Tese%20de%20mestrado%20Raquel%20Vieira%20Outubro%202006%20Corrigida.pdf)

(Wikipédia, 2016a) Wikipédia. (2016a). Celulose. Retrieved July 22, 2016, from <https://pt.wikipedia.org/wiki/Celulose>

(Wikipédia, 2016b) Wikipédia, a enciclopédia livre. (2016b). Peróxido de hidrogénio. Retrieved August 11, 2016, from https://pt.wikipedia.org/wiki/Per%C3%B3xido_de_hidrog%C3%AAnio

(Zhang et al., 2009) Zhang, L., D’Acunzi, M., Kappl, M., Auernhammer, G., & Vollmer, D. (2009). Hollow silica spheres: synthesis and mechanical properties.

(Zille, 2011) Zille, A. (2011). O uso da nanotecnologia na funcionalização de materiais fibrosos. Retrieved from <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/15100>